

**Präklinische Untersuchung von Perfluorodecalin
gefüllten Albuminkapseln als Blutersatzstoff *in*
vitro, am isolierten Organ sowie im lebenden Tier**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
– Dr. rer. nat. –

vorgelegt von

Anna Wrobeln

geboren in Hattingen

Institut für Physiologische Chemie
Universität Duisburg-Essen

2017

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Oktober 2013 bis September 2017 im Arbeitskreis von Prof. Dr. Dr. H. de Groot am Institut für Physiologische Chemie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

Tag der Disputation: 12.01.2018

Vorsitzender: Prof. Dr. O. J. Schmitz

Gutachter: Prof. Dr. M. Kirsch

Prof. Dr. C. Mayer

Prof. Dr. K. D. Schlüter

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
2 Theoretische Grundlagen	3
2.1 Künstliche Sauerstoffträger als Blutersatzmittel	3
2.2 Perfluorocarbone.....	5
2.3 Albumin als Kapselwandmaterial	7
2.4 Zielsetzung der Arbeit	8
3 Material und Methoden.....	10
3.1 Material	10
3.1.1 Geräte	10
3.1.2 Verbrauchsmaterial	11
3.1.3. Verwendete Puffer, Lösungen, Pharmaka und Antikörper.....	13
3.1.4 Chemikalien und Kits.....	14
3.1.5 Versuchstiere.....	14
3.1.6 Software	15
3.2 Methoden	15
3.2.1 Kapselsynthese	15
3.2.2 Laser Scanning Mikroskopie-Kapselfixierung	17
3.2.3 Rasterelektronenmikroskopie	18
3.2.4 Bestimmung der Größenverteilung und des Zetapotenzials	18
3.2.5 Langzeitstabilität.....	20
3.2.6 Optimierung der Kapselsynthese.....	20
3.2.7 Messung der Sauerstofftransportkapazität	20
3.2.8 <i>In vivo</i> Versuche	23
3.2.8.1 Allgemeiner Operationsverlauf.....	23
3.2.8.2 Untersuchung potenziell toxischer Effekte	26
3.2.8.3 Bestimmung der intravasalen Halbwertszeit	27
3.2.8.4 Hämodilution	28

3.2.9 Histologische Untersuchungen	31
3.2.9.1 Hämatoxylin-Eosin Färbung	31
3.2.9.2 Makrophagen Färbung der Milz	31
3.2.10 Herzperfusion nach Langendorff	33
3.2.10.1 Dosis Determination	37
3.2.10.2 Repetition	37
3.2.10.3 Massive Flussreduktion	37
3.2.11 Statistik	38
4 Ergebnisse	39
4.1 Kapselform	39
4.2 Optimierung der Kapselsynthese	40
4.3 Bestimmung der Langzeitstabilität	41
4.4 Untersuchung potentiell toxischer Effekte (64 Vol% und optimierte Kapseln)	43
4.4.1 Einfluss auf systemische Parameter	44
4.4.2 Einfluss auf Säure-Base-Haushalt und metabolische Parameter	47
4.4.3 Einfluss auf Organschädigungsparameter	51
4.4.4 Einfluss auf Elektrolyte, Hämoglobin und Hämatokrit	53
4.4.5 Einfluss auf Organstrukturen	54
4.5 Halbwertszeit	58
4.7 Herzperfusion nach Langendorff	58
4.7.1 Messung der Sauerstofftransportkapazität	58
4.7.2 Dosis Determination	59
4.7.3 Repetition	60
4.7.4 Massive Flussreduktion	61
4.8 Hämodilution	63
4.8.1 Einfluss auf das Überleben der Tiere	63
4.8.2 Einfluss auf systemische Parameter	64
4.8.3 Einfluss auf Säure-Base-Haushalt und metabolische Parameter	67

4.8.4 Einfluss auf Organschädigungsparameter.....	70
5 Diskussion	72
5.1 Kapselsynthese und Gestalt	72
5.1.1 Standardsynthese.....	72
5.1.2 optimierte Kapselsynthese	73
5.2 Langzeitstabilität	75
5.3 Untersuchung zur Toxizität von 64 Vol% und optimierten Kapseln	76
5.4.1 Einfluss auf systemische Parameter.....	77
5.4.2 Einfluss auf Säure Base Haushalt, metabolische Parameter und Organintegrität.....	78
5.4.3 Histologische Veränderungen durch Kapselinfusion- Leber und Milz.....	82
5.5 Halbwertszeit	83
5.6 Funktionalität im isoliert perfundierten Organ.....	85
5.7 Hämodilution	88
6 Ausblick.....	92
7 Zusammenfassung.....	94
8 Literatur	96
9 Anhang	109
9.1 Abkürzungsverzeichnis	110
9.2 Publikationsliste, Konferenzteilnahmen und Preise.....	111
9.2.1 Eigene Publikationen.....	111
9.2.2 Wissenschaftliche Vorträge	111
9.2.3 Posterpräsentationen	112
9.2.4 Published Abstracts.....	113
9.2.5 Preise	113
9.3 Lebenslauf	114
9.4 Erklärung.....	115
9.5 Danksagung	116

1 Einleitung

In den letzten Jahrzehnten gewann die Entwicklung von künstlichen Sauerstoffträgern als Blutersatzmittel immer mehr an Bedeutung [1-3]. Da einerseits die Bereitschaft der Bevölkerung Blut zu spenden immer geringer wird, andererseits jedoch der Bedarf an Bluttransfusionen zunimmt wird die Option Blut durch einen synthetischen Stoff zu ersetzen immer bedeutender. Bei der Entwicklung eines synthetischen Blutersatzes ist die Möglichkeit einer effizienten Versorgung der Gewebe mit Sauerstoff gleichermaßen essentiell wie das Abführen von anfallendem Kohlendioxid [1]. Vorteile eines synthetischen Blutersatzes im Vergleich zu gespendetem Blut, in Form von Konserven, sind unter anderem eine mögliche längere Lagerfähigkeit ohne Einschränkungen der Qualität und die Verringerung von möglichen, mit Blutkonserven assoziierten, akuten sowie langfristigen Nebenwirkungen. So ist bekannt, dass sich die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Blutkonserven während der Lagerung verändern. Die daraus resultierenden Konsequenzen dieser Veränderungen sowie die optimalen Lagerbedingungen für Konserven konnten bis heute nicht eindeutig definiert werden [4; 5]. Ein synthetischer Blutersatz wäre jederzeit sofort einsetzbar, so dass die substituierende Therapie eines beispielsweise verunfallten Patienten unmittelbar vor Ort beginnen könnte und damit wertvolle Zeit im Kampf um das Überleben gewonnen würde. Weitere denkbare Einsatzmöglichkeiten eines künstlichen Blutersatzstoffes sind dabei sehr vielfältig, so wäre die Therapie des hämorrhagischen Schocks und die damit verbundene essentielle Versorgung von Gewebe mit Sauerstoff nur eine mögliche Anwendung. Vorstellbar wäre auch ein Einsatz bei Operationstechniken mit einhergehendem hohem Blutverlust, dem Einsatz bei der Verwendung von Herz-Lungen-Maschinen oder die Behandlung von Patienten, die Fremdblut aufgrund von religiösen Gründen ablehnen.

Neben der Möglichkeit, den physiologischen Sauerstoffträger des Bluts (Hämoglobin) zu verwenden, ist eine vielversprechende Strategie der Einsatz von Perfluorocarbon als künstlicher Sauerstoffträger [6-9]. Im Jahr 1966 ist es Clark und Gollan [10] zum ersten Mal gelungen, das Leben eines Säugetiers durch Flüssigventilation mit einem Perfluorocarbon aufrecht zu erhalten. In einigen Ländern sind künstliche Sauerstoffträger bereits im Einsatz, so findet man in Russland, Ukraine, Mexiko, Kirgisistan und Kasachstan das Perfluorocarbon-basierte Perftoran® auf dem Markt [6; 11]. Behörden in Europa, Japan und den USA lehnen dieses Produkt allerdings

aufgrund von unausgewogenen Risiko-Nutzen-Analysen ab. Tatsächlich zeigen die aktuellen Perfluorocarbon Produkte Nebenwirkungen [12]. Da Perfluorocarbone für eine intravenöse Verabreichung in eine blutkompatible Form überführt werden müssen [13] werden sie oftmals emulgiert oder eingekapselt [6; 14-16]. In diesen Fällen konnten biologische Inkompatibilitäten, aufgrund des verwendeten Emulgators oder Immunreaktion auf das zur Einkapselung verwendete synthetische Polymer beobachtet werden [14; 15; 17-19].

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein neuer vielversprechender Ansatz untersucht, indem das flüssige Perfluorocarbon (Perfluorodecalin) in ein biologisch vorkommendes Biopolymer (Albumin) eingekapselt wurde. Damit wurden erstmals zur Synthese keinerlei Emulgatoren oder synthetische Hüllmaterialien verwendet, die in den bis dato untersuchten künstlichen Sauerstoffträgern zu starken Nebenwirkungsprofilen geführt hatten.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Künstliche Sauerstoffträger als Blutersatzmittel

„Blut ist eine Suspension von Zellen in einer proteinhaltigen Elektrolytlösung (Blutplasma) und dient als Transportmittel für Gase, Wirkstoffe, Nähr- und Abfallstoffe.“ [20]. Eine Versorgung aller Organe mit essentiellen Stoffen ist durch das blutgefüllte Gefäßsystem gewährleistet. Neben der Funktion als Transportmittel besitzt das Blut noch weitere unzählige Aufgaben wie etwa die Regulation des Wärmehaushalts und des pH-Wertes, die Abwehr von Krankheitserregern sowie den Verschluss von Wunden, um nur einige zu nennen. Dramatisch und mit dem Leben meist nicht vereinbar sind daher massive Blutverluste. Im Jahr 1818 wurde durch den britischen Geburtshelfer James Blundell erstmalig eine erfolgreiche Bluttransfusion durchgeführt [21]. Bis heute ist die Verabreichung von Erythrozytenkonzentraten der einzig effiziente Weg, um hohe Blutverluste zu kompensieren und damit eine der wichtigsten therapeutischen Maßnahmen der gegenwärtigen Medizin. Dabei gilt es bis dato, gewisse Herausforderungen zu meistern und Transfusions- bedingte Komplikationen in Kauf zu nehmen. Die Anwendung von Erythrozytenkonzentraten kann beispielsweise mit immunologisch vermittelten Reaktionen oder sogar Infektionen assoziiert sein [22; 23]. Unumstritten ist, dass die Lagerung von Erythrozytenkonzentraten zu Veränderungen der Produkte führt und damit einhergehend wird sowohl die klinische Effizienz als auch der Einfluss auf den Patienten diskutiert [24]. Aktuell können Erythrozytenkonzentrate unter Kühlung bei 4°C nur maximal 49 Tage gelagert werden [24], daher werden sowohl die maximale Haltbarkeit als auch die optimalen Lagerbedingungen immer wieder aktuellen Erkenntnissen angepasst [4; 5].

Synthetische Blutersatzmittel sollten optimalerweise möglichst viele Funktionen des Blutes übernehmen und gleichzeitig eine bessere Haltbarkeit sowie einfachere Lagerbedingungen aufweisen. Neben der Funktionalität im Hinblick auf die adäquate Versorgung der Gewebe mit Sauerstoff sollte ein synthetisches Blutersatzmittel blutgruppenunabhängig sowie ohne Infektionsrisiko einsetzbar sein. Eine lange Zirkulationsdauer im Gefäßsystem bei geringem Nebenwirkungsprofil ist wünschenswert [25]. Es wird deutlich, dass die Ansprüche an ein derartiges Produkt sehr hoch sind, daher konzentriert sich die aktuelle Forschung zunächst auf die

Hauptfunktion des Blutes: den Transport von Sauerstoff (künstliche Sauerstoffträger). Diese Aufgabe wird im Blut von den Erythrozyten übernommen. Sie besitzen im inneren den Blutfarbstoff Hämoglobin. Das Hämoglobin ist das für den Transport von Sauerstoff und den Abtransport von Kohlenstoffdioxid verantwortliche Molekül. Der Sauerstoff wird in den Lungenkapillaren der Alveolen an das Hämoglobin gebunden, wobei die Kontaktdauer zwischen Erythrozyt und Alveolarraum lediglich 0,3 Sekunden beträgt. Dann bewegt sich der Erythrozyt über das Gefäßsystem in die Gewebe der Peripherie, wo der Sauerstoff vom Hämoglobin abgegeben wird und in die Zellen gelangt. Genau dieses Verhalten sollte auch ein künstlicher Sauerstoffträger ausüben können. Dazu gibt es aktuell zwei hauptsächlich untersuchte Ansätze, zum einen liegt es nahe, den bluteigenen Sauerstoffträger Hämoglobin zu verwenden, zum anderen werden vollsynthetisch hergestellte Produkte, namentlich Perfluorocarbone, als Sauerstoffträger erforscht.

Die Verwendung von humanem sowie bovinem Hämoglobin birgt, neben der Möglichkeit Sauerstoff zu transportieren, auch einige Gefahren. So wurden Hämoglobin basierte Sauerstoffträger bereits in klinischen Studien untersucht (Hemopure®, HemAssist®, HemoLink®, Hemospan® oder PolyHeme®), wobei keines der Präparate einen eindeutig positiven Befund erhielt und daher die Herstellung der Produkte zum größten Teil wieder eingestellt wurde [26-32]. Lediglich Hemopure® ist in Südafrika seit 2001 für die Behandlung perioperativer Anämie bei Erwachsenen zugelassen. In besonders schweren Krankheitsfällen können Patienten mit Arzneimitteln ohne Zulassung behandelt werden. Unter dem sogenannten „compassionate use“ finden die Produkte Sanguinate™ (in USA) und Hemopure® (in USA, Südafrika, UK) klinische Anwendung [33]. Innerhalb der klinischen Studien der hämoglobinbasierten Präparate kam es zu unterschiedlichen Komplikationen. Entstehungsursache dieser Nebenwirkungen sind vermutlich große Mengen freien Hämoglobins. Befindet sich Hämoglobin außerhalb der Membran eines Erythrozyten zerfällt es in seine Dimere (α und β) und kann als Folge die Durchgängigkeit der Nierentubuli aufheben, so dass es schlussendlich zum Nierenversagen kommt [34]. Das freie Hämoglobin ist zudem aufgrund seiner geringen Größe in der Lage, zwischen die Endothelzellen der Gefäßwände zu gelangen. Aufgrund seiner hohen Affinität zu Stickstoffmonoxid wird dort freigesetztes Stickstoffmonoxid direkt an das Hämoglobin gebunden [35]. Durch die Bindung des endogenen Vasodilatators Stickstoffmonoxid kommt es zu einer verstärkten Vasokonstriktion der blutführenden Gefäße, die

schlussendlich zu einer systemischen Hypertension führen kann. Außerdem steigt die Sauerstoffaffinität des freien Hämoglobins stark an, da das in den Erythrozyten vorkommende 2,3-Bisphosphoglycerat, welches die Sauerstoffaffinität des Hämoglobins beeinflusst, nicht mehr vorhanden ist [36].

Dies stellt nur einzelne von vielen möglichen Szenarien bei der Verwendung von Hämoglobin als Sauerstoffträger dar und verdeutlicht, dass die Verwendung des Moleküls ohne eine passende Membran eher zu einer weiteren Verschlechterung der Sauerstoffversorgung und viel relevanter zu starken klinischen Komplikationen führen kann. Der andere Ansatz, im Hinblick auf die Entwicklung eines künstlichen Sauerstoffträgers, basiert auf der Verwendung von Perfluorocarbonen, die im folgenden Abschnitt genauer beschrieben werden.

2.2 Perfluorocarbone

Bei Perfluorocarbonen (PFCs) handelt es sich um synthetisch produzierte Kohlenwasserstoffverbindungen, deren Wasserstoffatome meist durch Fluor-Atome substituiert sind. PFCs sind in der Lage, Gase wie z. B. Sauerstoff abhängig vom vorherrschenden Partialdruck physikalisch zu lösen. Neben dem Sauerstoff ist es möglich, auch andere respiratorische Gase zu lösen und damit auch den Abtransport von physiologisch anfallendem Kohlenstoffdioxid aus dem Gewebe zu gewährleisten. Gleiches gilt für Kohlenmonoxid, das im Falle einer Rauchgasvergiftung im Körper zu finden ist und durch die PFCs abgeführt werden kann [37]. Trotz intensiver Forschung ist bis heute nicht vollständig geklärt, warum sich Gase in PFCs so hervorragend lösen. Sicher ist, dass es nicht chemisorbiert wird sondern, dass die Gase physikalisch in den PFCs gelöst werden, basierend auf dem Henry Dalton Gesetz [38]. Anders als beim Hämoglobin, wo die Sauerstoffbindung durch die Konformationsänderung des Moleküls begünstigt wird, besteht bei den PFCs ein direkter linearer Zusammenhang zwischen dem Sauerstoffpartialdruck und der gelösten Menge an Sauerstoff. Das heißt, physiologisch relevante Konzentrationen von Sauerstoff können bei Beatmung mit sehr hohen Sauerstoffpartialdrücken erreicht werden. Im Vergleich zum Hämoglobin tritt bei den PFCs keine Sättigung ein, so dass die Sauerstoffkonzentration beispielsweise in einer Druckkammer noch weiter erhöht werden kann. Abbildung 1 verdeutlicht diesen Zusammenhang, indem der Sauerstoffgehalt abhängig vom Sauerstoffpartialdruck bei Blut sowie verschiedenen PFC-Emulsionen (Perftoran® und Oxgent®) dargestellt ist.

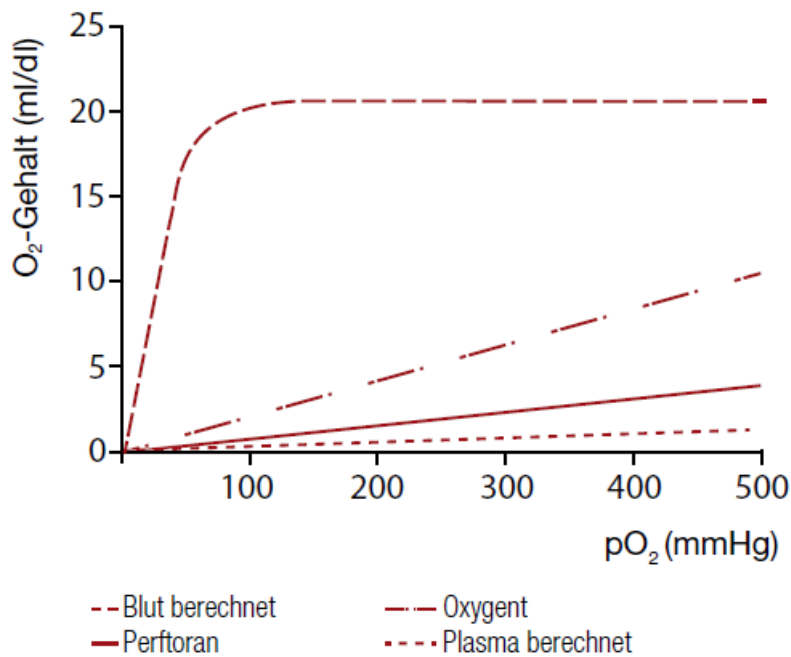


Abbildung 1: Sauerstoffgehalt in Abhängigkeit des Sauerstoffpartialdrucks Dargestellt sind die sigmoidale Bindungskurve des Blutes sowie der direkte lineare Zusammenhang zwischen dem Sauerstoffpartialdruck und der gelösten Menge an Sauerstoff bei den PFCs (Perftoran® und Oxygent®). Entnommen aus [25].

Die starke Kohlenstoff-Fluor-Bindung der PFCs ist der Grund für deren chemisch und metabolisch inertes Verhalten und die daraus resultierende gute Biokompatibilität [39]. Fluor ist das Element im Periodensystem mit der höchsten Elektronegativität, dies führt zu einer wesentlich dichteren Elektronenpackung und größeren Elektronenwolke, im Vergleich zu Wasserstoff. Diese Elektronendichte führt zu einer Abschirmung der Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindung und somit zu der ausgeprägten chemischen, biologischen und physikalischen Stabilität. Aufgrund dessen sind PFCs auch weder lipo- noch hydrophil und müssen für die Verwendung als künstliche Sauerstoffträger und dem damit einhergehenden Einsatz in wässrigen Flüssigkeiten wie Blut zunächst in eine kompatible Form gebracht werden.

PFCs sind nicht generell für eine intravenöse Applikation geeignet. So müssen neben der ausreichend hohen Löslichkeit von Gasen auch andere Parameter wie etwa die Möglichkeit zur Bildung von Emulsionen, die Halbwertszeit und die Organretentionszeit berücksichtigt werden [38; 40]. Zudem müssen die für medizinische Zwecke verwendeten PFCs einen ausreichend hohen Dampfdruck besitzen, um final in der Lunge ausgeatmet werden zu können [27]. Relevant, da sie die geforderten

Anforderungen erfüllen, sind daher Perfluorodecalin ($C_{10}F_{18}$), Perfluorooctylbromid ($CF_3(CF_2)_7Br$), Perfluordichlorooctan ($C_8Cl_2F_{16}$) und Perfluortertbutylcyclohexan ($C_{10}F_{20}$).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das bityklische PFC Perfluorodecalin (PFD) eingesetzt und in Albumin ummantelter Form genauer untersucht. PFD ist, als Hauptkomponente von Perftoran®, das bis jetzt meist in humanen Studien untersuchte PFC und eignet sich daher besonders für die Entwicklung eines derartigen Produkts. Laut Hersteller (Fluoromed) weist es eine Sauerstofflöslichkeit von 49ml/100ml (bei 25°C) auf und besitzt eine Organretentionszeit von 7 Tagen [38].

2.3 Albumin als Kapselwandmaterial

Das etwa 66 kDa große Biopolymer Albumin ist ein im Blutplasma vorkommendes Protein. Mit einem Gehalt von 60% stellt es die Hauptfraktion aller im Plasma vorkommenden Proteine dar [41]. Im Blutkreislauf erfüllt Albumin zwei wesentliche Aufgaben, zum einen den Transport von hydrophoben Stoffen wie etwa Hormone und Fettsäuren, zum anderen dient es der Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Drucks. Dabei ist der kolloidosmotische Druck für eine homogene Verteilung von Flüssigkeiten im Körper unerlässlich [42]. Da Albumin also bereits natürlicherweise im Blutplasma vorhanden ist können toxische oder antigene Reaktionen des Körpers ausgeschlossen werden [42]. Daher ist die klinische Anwendung von Albuminpräparaten seit Jahren etabliert. Diverse Volumenersatzlösungen sind zur Wiederherstellung und Aufrechterhaltung des Blutvolumens bei der Behandlung von Patienten mit Hypovolämie oder hämorrhagischem Schock zugelassen (z. B. Albiomin®) [42-44].

Eine weitere Verwendung von Albumin ist die Möglichkeit das Protein als Transportmittel von pharmakologisch wirksamen Substanzen zu verwenden [42]. Dabei werden unter anderem Antibiotika, Schmerzmittel oder Chemotherapeutika (Abraxane®) in Albuminpartikel verpackt [45-48]. Es konnte gezeigt werden, dass die Arzneistoffe so über einen langen Zeitraum freigesetzt werden und an spezifische Gewebe im Körper gelangen (z. B. Tumorzellen) [45; 49]. Darüber hinaus wird Albumin zum Schutz vor Degradation durch das Immunsystem, als Hüllprotein eingesetzt. Hierbei werden Nanopartikel durch Albumin beschichtet und dieses bildet dann eine Schutzbarriere, so dass Immunreaktionen vermieden werden und eine längere

Aufenthaltsdauer der Arzneistoffe im Körper gewährleistet ist [50]. Studien konnten zeigen, dass Albumin einen wirksameren Schutz vor dem Immunsystem bietet als die, in diesem Zusammenhang, meist verwendete synthetischen Materialien [51; 52].

Als Hilfsmittel in der kardialen Diagnostik sind 3-5 µm große Albuminkapseln in Europa und den USA zugelassen (Optison®). Die Kapseln sind dabei mit einem gasförmigen PFC dem Perfluotren gefüllt (ähnlich wie bei dem im Rahmen dieser Arbeit angewandten künstlichen Sauerstoffträger). Als Kontrastmittel wird Optison® allerdings nur in sehr geringen Mengen verabreicht (maximal 8,7 ml). Bei der Anwendung als Sauerstoffträger müssten deutlich höhere Volumina appliziert werden. Interessanterweise ist Albumin im Zusammenhang mit künstlichen Sauerstoffträgern sowohl im Hämoglobin basierten Ansatz [53-55] als auch im PFC basierten Ansatz [8] bereits in Erscheinung getreten. Gerade bei der Herstellung von PFC Produkten scheint der Einsatz von Albumin sinnvoll, da der amphiphile Charakter des Moleküls die Anwesenheit von Emulgatoren während der Synthese überflüssig macht [56]. Das eingeschränkte Vorkommen und die kostenintensive Herstellung von humanem Serumalbumin sind durch den Einsatz von rekombinant hergestelltem humanem Albumin vermeidbar. Einige pharmazeutische Produkte (Recombumin®), in denen das rekombinante humane Serumalbumin in geringen Konzentrationen eingesetzt wird, sind bereits in klinischen Studien erprobt [57]. Die genannten Eigenschaften und vorangegangenen Studien zeigen, dass Albumin ein ausgesprochen geeignetes Material zur Synthese von Kapseln als künstliche Sauerstoffträger darstellt.

2.4 Zielsetzung der Arbeit

Die finale Destination der in dieser Arbeit charakterisierten Perfluorodecalin gefüllten Albuminkapseln ist der Einsatz als Arzneimittel in der Versorgung von Patienten mit verschiedensten Symptomen. Dabei sollen die Kapseln als künstliche Sauerstoffträger ihren Verwendungszweck finden und so bei Patienten in lebensbedrohlichen Situationen wie zum Beispiel nach massivem Blutverlust durch Polytrauma und Operationen oder bei der Therapie einer Rauchgasvergiftung angewandt werden. Da der hier einzusetzende Sauerstoffträger, in Form von Perfluorodecalin, nicht mit wässrigen Lösungen mischbar ist muss die Substanz zunächst in eine blutkompatible Form überführt werden. Im Vergleich zu bisherigen Arbeiten wird in der vorliegenden Arbeit für die Synthese der Perfluorodecalin gefüllten Albuminkapseln kein Emulgator verwendet, der in früheren Studien mit starken Nebenwirkungen in Zusammenhang

gebracht werden konnte [14; 15; 17-19]. Der Einsatz eines Emulgators ist nicht erforderlich, da für die gewählte Synthesemethode als Kapselwandmaterial das Biopolymer Albumin verwendet wird. Die im Rahmen dieser Arbeit zur Synthese angewandte Methode der Ultraschallbehandlung führt bei Einsatz von Proteinlösungen und unpolaren Flüssigkeiten (z. B. PFD) zu Mikrosphären in hoher Konzentration mit geringer Größenverteilung [58].

Ziel der Arbeit ist zunächst, aufbauend auf die initialen Ergebnisse der Masterarbeit „Synthese und Charakterisierung von Perfluorodecalin gefüllten Albuminkapseln als Sauerstoffträger“ [59], die weitere *in vitro* Charakterisierung der Albuminkapseln, wobei das Augenmerk auf der Analyse der Form und Struktur der Kapseln gelegt werden soll. Des Weiteren soll, im Hinblick auf eine spätere Verwendung als Arzneimittel, die Größenverteilung der Kapseln und deren anhaltende Stabilität in unterschiedlichen Lagermedien genauer untersucht werden. Eine Optimierung der Kapselsynthese soll zu einer Reduktion der Kapselgröße sowie zu einer engeren Größenverteilung führen.

Im Modell der Ratte sollen, aufbauend auf den Ergebnissen der Dissertation von Frau Dr. Laudien, verschiedene Kapselsuspensionen auf mögliche toxische Effekte untersucht werden. Dabei sollen Vitalparameter, Blutgasanalysen, Histologie sowie Organschädigungsparameter erhoben werden.

Im nächsten Schritt soll die Funktionalität der Kapseln in einem isolierten Organ gezeigt werden. Dazu wird das sauerstoffsensitive Organ Herz gewählt, dessen Vitalität stark von der Versorgung mit ausreichend Sauerstoff abhängt und daher ein optimales Werkzeug zur Überprüfung der Funktionalität eines künstlichen Sauerstoffträgers darstellt.

Nach dem Funktionsnachweis im isolierten Organ soll final, durch eine Hämodilution im Modell der Ratte, die Eigenschaft der Kapseln Sauerstoff zu transportieren *in vivo*, in einem intakten Organismus, evaluiert werden. Dabei sollen ein massiver Austausch des Blutes gegen die Albuminkapseln erfolgen und ähnlich wie im Modell der toxischen Untersuchung Vitalparameter, Blutgasanalysen sowie Organschädigungsparameter erhoben werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Die in diesem Abschnitt dargestellte Tabelle zeigt die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Geräte (Tabelle 1).

Tabelle 1: Liste der verwendeten Geräte.

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Beheizbarer Kleintier Op-Tisch	Typ 13511	Medax, Rendsburg, DE
Blutgasanalysegerät	ABL 715	Radiometer, Kopenhagen, DE
Blutplasmaanalysegerät	Respons® 920	DiaSys, Holzheim DE
Chirurgische Instrumente		Fine Science Tools, Heidelberg, DE
Feinwaage	SBC 21	Scaltec, Heiligenstadt, DE
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 100 M	Zeiss, Jena, DE
Hämatokritzentrifuge	Universal 320R	Hettich, Bäch, Schweiz
Hämlilton Spritze	Hamilton 705N, 50 µl Spritze	Hamilton Company, Nevada, USA
Lichtmikroskop	AXIO Lab A.1	Zeiss, Jena, DE
Magnetrührer	IKA-Combimag RCH	IKA, Staufen, DE
Medizinische Temperatursonde	D-RB3	ASMUTH Medizintechnik GmbH, Minden, DE
Monitor	Biomonitor Sirecust 960	Siemens Medical Electronics, Danvers, MA, USA
Narkose-Verdampfer	Isofluran VET. MED Vapor/Sulla 808	Dräger, Lübeck, DE
Objektiv 10 x (Lichtmikroskop)	A-Plan 10x/0,25	Zeiss, Jena DE
Objektiv 40 x (Lichtmikroskop)	A-Plan 40x/0,65	Zeiss, Jena DE
Objektiv 40 x (LSM)	Achrostigmat 40x/1,3	Zeiss, Jena, DE
Objektiv 63 x (LSM)	Plan-Apochromat 63x/1,40 Oil	Zeiss, Jena, DE
Perfusor	Secura FT	Braun, Melsungen, DE
pH-Meter	765 Calimatic	Knick, Berlin, DE
Respirometer	Oroboros-2K	Oroboros Instriments, Innsbruck, Österreich

Rotationsmikrotom	RM 2235	Leica, Wetlar, DE
Spritzenpumpe	Model 2010	Medfusion Inc, Raleigh, USA
	KDS Legato 100	Cole Parmer®,
	78-8100C	Wertheim, DE
Sterilbank	HERA safe	Heraeus, Hanau, DE
Ultraschallprozessor	UP 400S	Hielscher Ultrasonics, Teltow, DE
Ultraschallsonde	Sonotrode H3, Durchmesser der Sonotrodenspitze 3 mm, Länge ca. 100 mm	Hielscher Ultrasonics, Teltow, DE
Vortexer	GLW L46	Oehmen Labortechnik, Essen, DE
Wasseraufbereitungsanlage	Milli Q® Advantage A10	Merck, Darmstadt, DE
Wasserbad	Thermostat 2761	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, DE
Zentrifuge	Biofuge primo R mini spin	Heraeus, Hanau, DE Eppendorf, Wesseling, DE
Zetaziser ZS		Malvern Instruments, Malvern, UK

3.1.2 Verbrauchsmaterial

Die in diesem Abschnitt dargestellte Tabelle zeigt die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien (Tabelle 2).

Tabelle 2: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien.

Material	Modell	Hersteller
Aktivkohlefilter	AP9999 Aldasorber Medical Filter	NorVap, Cardiff, GB
Chirurgisches Nahtmaterial	Resorba	Resorba medical GmbH, Nürnberg, DE
Deckglas	Deckgläser Ø 28 mm # 1	Menzel, Braunschweig, DE
Dreiwegehahn und Spülsystem	Druckdom	Smith Medical, Grasbrunn, DE
Druckmanschette	K+Sp	MediPlac, Borcheln, DE
Druckumwandler	MX960	Medex Medical Ltd, Rossendale, UK

Eppendorfreaktionsgefäß	Reaktionsgefäß 1,5 ml, 2,0 ml	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Falcon	Röhre 15 ml, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Handschuhe	Peha-soft-nitril	Hartmann, Heidenheim, DE
Hämatokritversiegelungskit		Brand, Wertheim, DE
Immersionsöl	518 C	Zeiss, Jena, DE
Kanüle-blau	BD Eclipse Needle 0,6 mm x 30 mm (23 G x 1 ^{1/4})	BD, Heidelberg, DE
Kanüle-grau	BD Eclipse Needle 0,4 mm x 19 mm (27 G x 3/4)	BD, Heidelberg, DE
Mikro-Hämatokrit-Kapillare		Brand, Wertheim, DE
Mikroskop-Reinigungstücher	Lens Cleaning Tissue 105	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Objektträger	SuperFrost®, blau	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Perfusionsleitung	Original Perfuser® Line Typ: IV-Standard	B. Braun, Melsungen, DE
Perfusor Spritze	Original Perfusor®-Spritze 50 ml	B. Braun, Melsungen, DE
Pipettenspitze	10 µl, 100 µl, 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Polyethylene Schlauch	Poretex™ 0,58mm ID, 0,96mm AD	
Pulsoximeter		Nellcor, Boulder, CO, USA
Spritze	BD Discardit, 1 ml, 2 ml, 5 ml	BD, Heidelberg, DE
Spritze zur Blutentnahme 2 ml	PICO-Probennehmer	Radiometer, Willich, DE
Verlängerungsleitung	BD-Microlane 3/ 10 cm	BD, Heidelberg, DE
Vierwegehahn	BD Connecta	BD, Heidelberg, DE
Vliesskompressen	BeeSana®	Sana, Alsdorf, DE
Wattestäbchen	Mai-Med-Tip	Mai-Med, Neuenkirchen, DE

3.1.3. Verwendete Puffer, Lösungen, Pharmaka und Antikörper

Die in diesem Abschnitt dargestellten Tabellen zeigen die im Rahmen dieser Arbeit selbst hergestellten Puffer und Lösungen (Tabelle 3), Pharmaka und Antikörper (Tabelle 4).

Tabelle 3: Zusammensetzung verwendeter Puffer und Lösungen.

Puffer/ Lösung	Zusammensetzung
Citratpuffer	Stammlösung A: 0,1 M Citronensäure ($C_6H_8O_7 \times H_2O$) mit Stammlösung B: 0,1 M Natrium Citrat ($C_6H_6O_7 \times H_2O$) im Verhältnis 2:8 vermengen und auf 10% mit <i>aqua bidest.</i> verdünnen
Eisbad (-20°C)	500 ml Eis 50 ml Methanol 10 g NaCl
PBS+Tween (PBST)	PBS + 0,5% Tween 20
Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)	NaCl 137 mM KCl 2,6 mM KH ₂ PO ₄ 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ 8,1 mM In <i>aqua bidest</i> Lösen, pH 7,4 einstellen

Tabelle 4: Verwendete Pharmaka und Antikörper.

Lösung	Hersteller
Anti-Maus IgG (H+L) biotinyliert, affinitätsgereinigt, Ratte absorbiert (Zweitantikörper)	Biologo, Kronshagen, DE
CD 68-Ratten Makrophagen/Monozyten (ED1) (Erstantikörper)	Biologo, Kronshagen, DE
HSA 5%	Baxter
Isofluran (Forene®)	Abbot, Hannover
Ketamin 10%ig als Hydrochlorid	Ceva Tiergesundheit, Düsseldorf, DE
NaCl 0,9%	B. Braun, Melsungen, DE
Xylocain 1%ig (Lidocainhydrochlorid-Monohydrat)	Astra Zeneca, Wedel, DE

3.1.4 Chemikalien und Kits

Die in diesem Abschnitt dargestellte Tabelle zeigt die im Rahmen dieser Arbeit angewandten Chemikalien und Kits (Tabelle 5). Hier nicht aufgeführte Chemikalien und Kits wurden von Sigma Aldrich (St. Louis, USA), Merck (Darmstadt, DE) oder Roth (Karlsruhe, DE) bezogen.

Tabelle 5: Liste der verwendeten Chemikalien.

Chemikalie	Hersteller
ALAT FS IFCC	DiaSys Diagnostic Systems GmbH, Düsseldorf, DE
Albumin, Rind, IgG frei (BSA)	Roth, Karlsruhe, DE
ASAT FS IFCC	DiaSys Diagnostic Systems GmbH, Düsseldorf, DE
CK-NAC FS	DiaSys Diagnostic Systems GmbH, Düsseldorf, DE
Creatinine FS	DiaSys Diagnostic Systems GmbH, Düsseldorf, DE
DAB Quanto	Thermo Scientific, DE
Dako® Proteinblock	Dako Corporation, Carpinteria, USA
D-Glukose	Roth, Karlsruhe, DE
FITC-Albumin (Albumin, Fluorescein isothiocyanate, konjugiert, Rind)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Formaldehydlösung 4%	Roth, Karlsruhe, DE
Hämatoxilin	Thermo Scientific, DE
LDH FS IFCC	DiaSys Diagnostic Systems GmbH, Düsseldorf, DE
Perfluordecalin HP (PFD)	F2 Chemicals Ltd., Lancashire, UK
Roti® Histokitt II (Mountingmedium)	Roth, Karlsruhe, DE
Vectastain ABC Kit	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Wasserstoffperoxid 30%	Roth, Karlsruhe, DE
Xylolersatz	Thermo Scientific, DE

3.1.5 Versuchstiere

Die Tierversuche (Abschnitt 3.2.8) im Rahmen dieser Arbeit wurden an adulten männlichen Wistar-Ratten mit einem Gewicht von 400-450 g durchgeführt. Die Tiere wurden im Zentralen Tierlaboratorium des Universitätsklinikums Essen (ZTL) gezüchtet. Die Haltung der Tiere erfolgte nach geltenden Tierschutzgesetzen ebenfalls

im ZTL unter standardisierten Bedingungen bei konstanter Temperatur ($22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) und konstanter Luftfeuchtigkeit ($55\% \pm 5\%$). Die Tiere unterlagen einem zwölfstündigen Hell-Dunkelrhythmus. Futter (Ssniff®-Spezialdiäten, Soest, Deutschland) und Wasser waren jederzeit frei zugänglich. Die durchgeführten Tierversuche wurden durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz (LANUV) genehmigt (G1383/13, AZ 84-02.04.2013.A391 und G1550/16, AZ 84-02.04.2016.A118).

Für die Versuche des isolierten Langendorff Herzens (Abschnitt 3.2.10) wurden weibliche Wistar-Ratten mit einem Gewicht von 225-275g und einem Alter von 4 Monaten verwendet. Die Tiere wurden im Zentralen Tierlaboratorium der Justus-Liebig Universität Gießen gezüchtet und gehalten. Die Haltung erfolgte nach geltenden Tierschutzgesetzen unter standardisierten Bedingungen bei konstanter Temperatur ($22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) und konstanter Luftfeuchtigkeit ($55\% \pm 5\%$). Die Tiere unterlagen einem zwölfstündigen Hell-Dunkelrhythmus. Futter (Ssniff®-Spezialdiäten, Soest, Deutschland) und Wasser waren jederzeit frei zugänglich.

3.1.6 Software

Die in diesem Abschnitt dargestellte Tabelle 6 zeigt die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Software.

Tabelle 6: Liste der verwendeten Software.

Software	Hersteller
Oroboros DatLab 4.3.2.4	Software Security Networks, Innsbruck, AUT
Graph Pad Prism 6.05	Graph Pad Software, La Jolla, CA, USA
LSM software (Axiovert 100)	Zeiss, Jena, DE
Microsoft Officepaket 2016	Microsoft, Redmond, WA, USA
ZEN blue 2.3	Zeiss, Jena, DE
Zetasizer software Version 7.11	Malvern Instruments, Malvern, UK

3.2 Methoden

3.2.1 Kapselsynthese

Wie in Wrobeln et al. beschrieben [60] wurden die in Tabelle 7 abgebildeten Bedingungen zur Synthese angewandt. Um aseptische Kapselsuspensionen zu erzeugen wurde ausschließlich unter einer Sterilbank synthetisiert. Zunächst wurde das für die gewünschte Kapselgröße vorgegebene Volumen 5%iges humanes

Serumalbumin (HSA 5%, Baxter) bzw. KH-Puffer mit bovinem Serum Albumin (BSA) 5% (Langendorff-Perfusion, Abschnitt 3.2.10) und PFD in ein Falcon (15 ml oder 50 ml) vorgelegt. Im Anschluss wurde das Falcon in ein Eisbad (gekühlte Synthese) oder einen Falconständer (ungekühlte Synthese) gebracht und dort stabil fixiert. Danach wurde die Spitze der Ultraschallsonde an die Grenzfläche von Albumin-Lösung und PFD gebracht und für die jeweils definierte Zeit mit der vorgegebenen Ultraschallintensität (siehe Tabelle 7) behandelt. Eine Ultraschallintensität von 100% entsprach 400 Watt mit einer Ultraschallfrequenz von 24 kHz. Kapseln mit einem Durchmesser ≥ 500 nm wurden nach der Synthese, mit Hilfe einer Hämatokritzentrifuge (16060 x g, 15 Minuten, 4°C) auf definierte Volumenanteile am Gesamtvolumen der Suspension eingestellt. Dazu wurde nach Zentrifugation (20 Minuten, 1500 x g, Raumtemperatur) entweder Albumin-Lösung abgenommen oder zugeführt. Zudem wurden die Trockengewichte der jeweiligen Kapselkonzentration bestimmt, indem jeweils 1 ml der entsprechenden Suspension bei 4500 x g für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Kapselpellet bei 37°C konstant gewogen wurde. Die ermittelten Trockengewichte der jeweiligen Kapselsuspension sind in Tabelle 8 abgebildet. Wenn nicht anders beschrieben, wird im Folgenden die Herstellung der Kapseln mit 100% Ultraschallintensität und 90 Sekunden Beschallungsdauer als „Standardsynthese“ benannt. Die Methode der optimierten Synthese und die daraus resultierenden Kapseln werden in Abschnitt 3.2.6 genauer beschrieben.

Tabelle 7: Darstellung der Synthesebedingungen für die jeweils durchschnittliche Kapselgröße (Durchmesser mittels Laser Scanning Mikroskopie (Abschnitt 3.2.2) ermittelt).

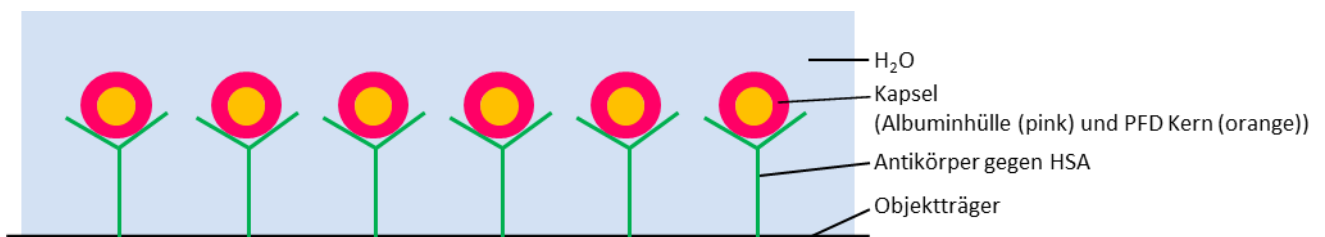
ca. Kapselgröße [µm]	Volumen Albumin (5%) [ml]	Volu men PFD [ml]	Falcon [ml]	Kühlung (-20°C)	Ultraschall- Intensität [%]/ [Watt]	Zeit
0,5	2,5	0,5	15	Ja	100/400	10 Minuten
1	5	1	15	Ja	100/400	90 Sekunden
3	5	1	15	Ja	40/160	30 Sekunden
5	10	2	50	Nein	20/80	30 Sekunden

Tabelle 8: Ermittelte Trockengewichte. Abgebildet sind die Mittelwerte \pm SD aus n=6 Kapselsynthesen.

Synthese	Kapseln	Trockengewicht
Standardsynthese	64 Vol%	23,15 \pm 1,1 mg/ml
Optimierte Synthese	optimierte Kapseln	19,95 \pm 2,8 mg/ml

3.2.2 Laser Scanning Mikroskopie-Kapselfixierung

Für die Synthese der Kapseln zur Laser Scanning Mikroskopie wurde eine 5%ige HSA Lösung verwendet, die zu 90% aus HSA sowie zu 10% aus FITC-HSA bestand. Dazu wurde in Reispflanzen rekombinant hergestelltes human Albumin, wie von Brookes und Kaufman im Jahr 2005 beschrieben [61], mit FITC markiert. Für eine bessere Visualisierung wurden Kapseln mit einem Durchmesser ≥ 1000 nm verwendet. Um eine bewegungsfreie Aufnahme zu ermöglichen wurden die Kapseln wie in Abbildung 2 gezeigt an einen Objektträger gebunden. Eine Fläche (0,5 x 0,5 cm) auf einem Polystyrol Objektträger wurde mit Hilfe eines Lipidstiftes abgegrenzt. Dann wurde innerhalb der Lipidgrenze ein Antikörper gegen HSA (Anti-HSA produced in rabbit, sigma A0433) aufgebracht, indem 1 ml Coating-Puffer mit 10-20 μ g/ml Anti-HSA über Nacht bei 4°C inkubiert wurde. Im Anschluss wurde die Fläche innerhalb des Lipidrahmens zweimal mit jeweils 1 ml Coating-Puffer (ohne Anti-HSA) gewaschen und 100 μ l der Kapseln (32 Vol% in H₂O, 1/100 verdünnt) über Nacht bei 4°C inkubiert. Zur Mikroskopie wurde um die Lipidgrenze Eindeckmedium verteilt und ein Deckglas aufgebracht. Die Messung erfolgte mit einem konfokalen, inversen Laser Scanning Mikroskop (Axiovert 100 M, Zeiss, Deutschland). Zur Anregung des verwendeten Fluoreszenzfarbstoffes wurde ein Argon-Laser genutzt. Das angewandte Objektiv war ein Öl-Immersions-Objektiv mit einer 63-fachen Vergrößerung. FITC-HSA konnte mit 488 nm angeregt werden und emittierte Licht mit einer Wellenlänge von 519 nm. Die Laserintensität lag bei 10%. Je analysierter Kapselsuspension wurden drei verschiedene Bildausschnitte beurteilt.

**Abbildung 2: Schematische Darstellung der Kapselfixierung.** Ein Objektträger wurde mit einem Antikörper gegen HSA beschichtet, an den die Kapseln fixiert wurden.

3.2.3 Rasterelektronenmikroskopie

Die Rasterelektronenmikroskopie wurde am „IMCES Imaging Center Essen“ des Universitätsklinikums Essen unter der Leitung von Prof. Dr. Elke Winterhager durchgeführt. Für die Untersuchung wurden Kapseln mittels Standardsynthese synthetisiert und in eine wässrige Lösung überführt. Im Anschluss wurden die Kapseln für 30 Minuten in einer 2,5%igen Glutaraldehydlösung inkubiert und durch die Quervernetzung der Albuminmoleküle fixiert. Da die Messung unter Vakuum durchgeführt wurde, war es nötig die Proben zu dehydrieren, um ein durch das Vakuum verursachtes Verdampfen des Wassers und damit die Beschädigung der Probe zu vermeiden. Dazu wurden die Kapseln auf einen mit Poly-Lysin beschichteten Glasobjektträger gebracht und durch eine Ethanolreihe mit aufsteigender Ethanolkonzentration dehydriert. Es schloss sich die kritische Punkt Trocknung (CPD 7501, Polaron) und das Sputtern mit Platin/Palladium (208HR, Cressington) an. Dann erfolgte die Rasterelektronenmikroskopie (Hitachi S-4000 SEM) und die Analyse der Bilder (DISS5 (Point Electronics) analysis system).

3.2.4 Bestimmung der Größenverteilung und des Zetapotenzials

Die Bestimmung der Größenverteilung und des Zetapotenzials der Kapseln erfolgte mit einem Zetasizer ZS (Malvern Instruments, Zetasizer software Version 7.11.) im Arbeitskreis von Prof. Dr. Matthias Eppe (Institut für Anorganische Chemie, Universität Duisburg-Essen).

Prinzip der Messung

Mit Hilfe der dynamischen Lichtstreuung eines Nanopartikels in einer Lösung ist es möglich dessen Größe zu bestimmen. Trifft Licht auf Nanopartikel in einer Suspension kommt es zur Streuung, wobei das gestreute Licht mehrerer Partikel miteinander sowohl konstruktiv als auch destruktiv interferiert. Die Streuung eines sphärischen Partikels kann mit Hilfe der Maxwell-Gleichung exakt berechnet werden. Wird kohärentes monochromatisches Licht verwendet, ist es möglich diese Interferenzen wahrzunehmen. Die Nanopartikel bewegen sich durch die Brown'sche Molekularbewegung in der Suspension, wodurch sich der Abstand der Partikel zueinander ändert und somit auch das gemessene Interferenzmuster. Ist die Temperatur und die Viskosität des umgebenden Mediums konstant, hängt die Brown'sche Bewegung von der Größe des Teilchens ab. Die gemessenen Daten können dann mithilfe der Stokes-Einstein-Beziehung in Größe und Größenverteilung

konvertiert werden. In wässriger Lösung werden immer auch die angelagerten Lösungsmittelmoleküle (also Wassermoleküle) mit gemessen, deshalb wird der hydrodynamische Radius bestimmt. Bei der Partikelgrößenverteilung handelt es sich um eine statistische Betrachtung der Normalverteilung, mit der einzelne Durchmesser der Partikel auftreten. Die Intensitätsverteilung zeigt die Partikelgröße an, die den größten Einfluss auf die Intensität der Streu-Strahlung hat. Die Intensität dieser Strahlung ist abhängig von der sechsten Potenz des Durchmessers, wodurch große Partikel einen erheblich größeren Einfluss auf das gemessene Streulicht haben als kleine Partikel und dadurch die Streu-Strahlung kleinerer Partikel überlagert.

Zur Messung des Zetapotenzials wird die Laser-Doppler-Mikro-Elektrophorese verwendet. Dabei wird ein elektrisches Feld an die zu messende Kapselsuspension angelegt. Die Partikel bewegen sich dann abhängig von ihrem Zetapotenzial mit einer bestimmten Geschwindigkeit in dem elektrischen Feld. Diese Geschwindigkeit wird durch Phasenanalyse der Lichtstreuung (M3-PALS- Phase Analysis Light Scattering) gemessen. Aus den erhaltenen Daten kann dann die elektrophoretische Mobilität und daraus das Zetapotenzial und dessen Verteilung berechnet werden.

Messung

Nach der Synthese (Standardsynthese) wurden die Kapselsuspensionen direkt gemessen oder in das jeweilige Medium (H_2O , HSA 5%, NaCl 0,9%) überführt. Dazu wurde je 1 ml der Kapselsuspension in ein 2 ml Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Danach wurden die Kapseln zentrifugiert (Raumtemperatur, 10 Minuten, $1355 \times g$) und der Überstand wurde verworfen. Dem Kapselpellet wurde 1 ml des jeweiligen Mediums (H_2O , HSA 5%, NaCl 0,9%) hinzu pipettiert und das Pellet wurde resuspendiert. Darauffolgend wurde die Suspension erneut zentrifugiert (Raumtemperatur, 10 Minuten, $1355 \times g$) und der Überstand verworfen. Dieser Austausch der Trägerlösung erfolgte insgesamt zehnmal. Zur Messung wurden 50 μl Kapselsuspension mit 950 μl des jeweiligen Mediums verdünnt. Die Verdünnung wurde dann in eine clear disposable zeta cell (Malvern DTS1070) überführt und bei 25°C mit einem Winkel von 173° (nichtinvasive Rückstreuung) im Intensitätsmodus gemessen. Dabei wurden die in Tabelle 9 abgebildeten konstanten Messparameter für das jeweilige Medium verwendet.

Tabelle 9: Zur Bestimmung der Größenverteilung und des Zetapotenzials verwendete (konstante) Messparameter.

Medium	H ₂ O	HSA 5%	NaCl 0,9%
Refraktionsindex	1,33	1,345	1,346
Viskosität [mPas]	0,89	1,25	0,89

3.2.5 Langzeitstabilität

Zur Untersuchung der Langzeitstabilität wurden Kapseln aus HSA 5% und PFD synthetisiert (Standardsynthese) und wie in Abschnitt 3.2.3 beschrieben in das jeweilige Medium überführt (HSA 5%, NaCl 0,9%, H₂O.). Die Messung der Größenverteilung sowie des Zetapotenzials erfolgte jeweils einen, drei und sieben Tage nach der Synthese. Bis zur Messung erfolgte die Lagerung der Dispersionen bei 4°C. Es wurden sechs Kapselsuspensionen pro Versuchsgruppe synthetisiert und gemessen.

3.2.6 Optimierung der Kapselsynthese

Um die Kapselgröße zu verringern und die Größenverteilung zu minimieren wurde die Kapselsynthese weiter optimiert. Dazu wurden die in Tabelle 7 dargestellten Parameter verwendet. Zum einen wurden dabei die Synthesereaktoren variiert (Falcon 15 ml, Reagenzglas Ø10 mm oder Reagenzglas Ø8 mm), zum anderen wurden die Gesamtvolumina (HSA 5% und PFD) verändert (6 ml, 3 ml, 1,5 ml) wobei das Verhältnis von HSA 5% zu PFD beibehalten wurde (HSA 5%: PFD / 5:1). Im Anschluss an die jeweilige Synthese wurde die Größenverteilung wie in Abschnitt 3.2.3 beschrieben bestimmt. Für jede Synthesemethode wurden zwei Kapselansätze gemessen.

Tabelle 10: Angewandte Parameter zur Optimierung der Kapselsynthese.

Gefäß	Falcon (15 ml)										Reagenzglas (Ø10 mm)				Reagenzglas (Ø8 mm)					
Gesamtvolumen	6 ml					3 ml					3 ml				1,5 ml					
Beschallungsart	kontinuierlich			pulsartig		kontinuierlich			pulsartig		kontinuierlich		pulsartig		kontinuierlich		pulsartig			
Dauer [min]	1,5	5	10	5	10	1,5	5	10	5	10	1,5	5	10	5	10	1,5	5	10	5	10

3.2.7 Messung der Sauerstofftransportkapazität

Zur Untersuchung der Sauerstofftransportkapazität wurde der jeweilige Sauerstoffgehalt, wie in Wrobeln et al 2017 beschrieben [62], von 4 Vol% Kapseln (Standardsynthese) in modifiziertem Krebs Henseleit-Puffer (KH-Puffer) sowie purem modifizierten KH-Puffer mit Hilfe eines Respirometers (Oroboros-2k, orooboros

instruments) ermittelt. Die genauen Zusammensetzungen der Lösungen sind in Tabelle 11 dargestellt. Gemessen wurde der von der Kapselsuspension oder dem KH-Puffer freigesetzte Sauerstoff in die Messkammer des Respirometers. Nach dem Henry-Gesetz ist der Sauerstoffgehalt von Flüssigkeiten proportional zum vorliegenden Sauerstoffpartialdruck. Wenn man Flüssigkeiten nun mit einem hohen Sauerstoffpartialdruck begast, werden diese den Sauerstoff aufnehmen und ihn bei einem Partialdruckgefälle wieder frei geben. Folglich kann die Sauerstofffreisetzung von der Kapselsuspension oder der Albuminlösung als Maß für die maximale Sauerstoffkapazität angenommen werden.

Tabelle 11: Im Versuch der Sauerstofftransportkapazität untersuchte Lösungen und deren Zusammensetzung.

Lösung	Zusammensetzung
KH-Puffer (modifiziert)	NaCl 105 mM
	KCl 2,7 mM
	NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O 1,5 mM
	MgCl ₂ x 6H ₂ O 2,0 mM
	Glukose 5,0 mM
	CaCl ₂ x 2H ₂ O 3,6 mM
	NaHCO ₃ 30 mM
	Bovines Serum Albumin 0,75 mM
	in <i>aqua bidest</i>
4 Vol%	4 Vol% Kapseln (Standardsynthese) in modifiziertem KH-Puffer (siehe oben)

Korrektur der Messabweichung

Vor Beginn der eigentlichen Messung wurde die Messabweichung des Gerätes mit Hilfe eines Sauerstoffstandards (Wasser) ermittelt. Dazu wurden die auf 37°C temperierten Messkammern des Respirometers mit 2 ml Wasser befüllt. Das Wasser wurde in den Messkammern unter ständigem Rühren inkubiert, bis sich unter dem atmosphärischen Luftdruck ein konstanter Sauerstoffgehalt eingestellt hat. Mittels dieses konstanten Sauerstoffmaximalwertes und dem theoretischen Sauerstoffgehalt des Wassers bei den gegebenen Bedingungen (= 209 mmol/ml) konnte der Korrekturfaktor ($F(O_2)$) für den Messfehler errechnet werden (Formel 1).

$$F(O_2)[\text{mmol/ml}] = \frac{\text{max. } O_2\text{-Gehalt}_{\text{Wasser}}(\text{soll})}{\text{max. } O_2\text{-Gehalt}_{\text{Wasser}}(\text{ist})}$$

Formel 1: Berechnung des Korrekturfaktors $F(O_2)$ für die Bestimmung der Sauerstoffkapazität

Vorbereitung der Messkammern

Zunächst wurden die Messkammern mit 2 ml Phosphatpuffer (PP-Puffer, 50 mM) befüllt und luftdicht verschlossen. Durch die Zugabe von 96 µl Hefe (83 mg/ml PP-Puffer) und 50 µl Glukose (1 M in PP-Puffer) wurde der im PP-Puffer gelöste Sauerstoff in der Messkammer (durch den aeroben Stoffwechsel der Hefe) entfernt. Um im Folgenden den aeroben Stoffwechsel der Hefe zu unterbinden, erfolgte die Zugabe von 60 µl Kaliumcyanid (KCN, 100 mM in PP-Puffer). KCN inhibiert den Komplex IV der Atmungskette, indem es dort die Übertragung der Elektronen auf den Sauerstoff unterbindet. Daraufhin erfolgte der Stoffwechsel der Hefe nur noch anaerob und es wurde so sichergestellt, dass diese im weiteren Versuchsverlauf keinen Sauerstoff mehr verbrauchte.

Sauerstoffbeladung

Zunächst wurde ein mit einem Septum verschlossenes Gefäß in ein 37°C erwärmtes Wasserbad gebracht und für eine Minute mit Carbogen (95% O_2 und 5% CO_2) durchspült. Dieses erfolgte um sicher zu stellen, dass die Beladung der verschiedenen Lösungen bei Carbogenatmosphäre und 37°C stattfindet. Nachdem auch die Lösungen (4 Vol% sowie modifizierter KH-Puffer) auf 37°C erwärmt waren, wurden 2 ml der jeweiligen Flüssigkeit über eine Kanüle mit Hilfe einer Spritze in das Gefäß appliziert. Die Lösungen wurde dann für 30 Sekunden in Carbogenatmosphäre unter ständigem Rühren inkubiert.

Messung der Sauerstofffreisetzung

Im Anschluss an die Begasung wurden jeweils 50 µl der Lösungen mittels einer gasdichten Hamilton Spritze entnommen und in die Messkammer des Respirometers appliziert. Der Maximalwert der Sauerstofffreisetzung wurde im Folgenden abgelesen. Unter zu Hilfenahme des zuvor bestimmten Korrekturfaktors (Formel 1) konnte die Sauerstoffkapazität der jeweiligen Flüssigkeit berechnet werden.

3.2.8 *In vivo* Versuche

In diesem Abschnitt werden die genauen Vorgehensweisen der verschiedenen *in vivo* Untersuchungen erläutert.

3.2.8.1 Allgemeiner Operationsverlauf

Anästhesie und Analgesie

Wie in Wrobeln et al. 2017 [60] beschrieben wurden die Ratten zur Narkoseeinleitung in einen Begasungstopf gesetzt, welcher mit Isofluran (2% Isofluran in 100% medizinischem O₂, und einem Durchfluss von 4 L/Minute) geflutet wurde. Bei Erreichen des gewünschten Toleranzstadiums wurden die Ratten in Rückenlage auf einen beheizten (38-40°C) Operationstisch gelagert. Die Anästhesie erfolgte weiterhin über eine Inhalationsmaske (1-2% Isofluran in 100% medizinischem O₂ mit einem Durchfluss von 1 L/Minute), die am Operationstisch angebracht war. Die Analgesie erfolgte durch eine subkutane Injektion von Ketamin (50 mg/kg Körpergewicht (KGW)) in die linke Flanke der Tiere. Eine Lokalanästhesie des Operationsbereichs der rechten Leiste erfolgte durch die subkutane Injektion von Xylocain (5 mg/kg KGW). Zur Sicherstellung freier Atemwege wurde die Zunge der Tiere leicht exponiert. Das Auskühlen der Tiere wurde durch Abdeckung mit Aluminiumfolie verhindert.

Eine adäquate Anästhesie und Analgesie während des gesamten Versuchs wurde durch die wiederholte Untersuchung des Zwischenzehenreflexes und des Corneareflexes sichergestellt und gegebenenfalls durch die Nachdosierung von Ketamin (25 mg/kg KGW) erreicht.

Katheterisierung der Femoralgefäße

Nachdem ein Ausbleiben des Zwischenzehenreflexes und des Corneareflexes zweifelsfrei festgestellt werden konnte, erfolgte eine etwa 2 cm lange Inguinalinzision der rechten Leiste. Im Anschluss wurden die *Arteria* und *Vena femoralis* frei präpariert. Mit Hilfe von zwei Wattetupfern wurde dazu, bis die Gefäße sowie das *Ligamentum inguinale* sichtbar wurden, in die Tiefe präpariert. Die Gefäße wurden dann von den umliegenden Geweben (Muskelgewebe, *Nervus femoralis*, Bindegewebe und Faszien) befreit und voneinander separiert. Um ein zeitnahes Biomonitoring und damit eine einwandfreie Überwachung der Anästhesie zu gewährleisten wurde mit der Katheterisierung der *Arteria femoralis* begonnen. Hierzu wurde das Gefäß mit einer Pinzette angehoben und distal ligiert. Der proximale Teil des Gefäßes wurde ebenfalls

von einer Ligatur umschlungen jedoch zunächst nicht ligiert. Dann erfolgte der Anschnitt der Arterienwand mit Hilfe einer Gefäßschere sowie darauffolgend das vorsichtige Einführen des luftblasenfreien, mit Ringerlösung gefüllten Katheters. Dieser wurde mit den distalen sowie proximalen Ligaturen fixiert. Der Arterienkatheter war zum Biomonitoring mit einem Druckumwandler verbunden, um den systolischen-, diastolischen- sowie mittleren arteriellen Blutdruck zu erfassen. Um dies zu ermöglichen, wurde der Arterienkatheter permanent, mit Hilfe einer Druckmanschette, mit Ringerlösung (3 ml/Stunde) durchspült. Im Anschluss erfolgte analog zur *Arteria femoralis* die Katheterisierung der *Vena femoralis*. Zur Verhinderung eines Flüssigkeitsverlustes über die Operationswunde wurde diese mit einer in NaCl 0,9% getränkten Fliesstoffkompressen abgedeckt. Außerdem erfolgte eine Dauerinfusion von NaCl 0,9% (5 ml/kg KGW) über den Venenkatheter, um den Flüssigkeitsverlust über die Operationswunde und das Flimmerepithel zu kompensieren. Unterbrochen wurde diese Infusion lediglich während der Infusionsintervalle der zu testenden Kapselsuspensionen bzw. der kapselfreien Kontrolllösung HSA 5%.

Biomonitoring

Im Anschluss an die Katheterisierung der Femoralgefäße folgte eine kontinuierliche Überwachung und Dokumentation der Vitalparameter (Biomonitoring). Jede zehnte Minute wurde der mittlere arterielle Blutdruck (MAP) auf dem Monitor abgelesen und die Herzfrequenz anhand der systolischen Blutdruckpeaks pro 2,5 Sekunden ermittelt. Die Atemfrequenz wurde über die Atembewegung pro 15 Sekunden gezählt und auf 1 Minute hochgerechnet. Die Sauerstoffsättigung des Blutes wurde über ein Pulsoximeter, welches an der linken Hinterpfote des Tieres angebracht war, erfasst. Die Körperkerntemperatur der Tiere wurde über eine Temperatursonde, welche ca. 2 cm in den Enddarm der Tiere eingebracht wurde, aufgezeichnet. Außerdem wurde die aktuelle Isoflurankonzentration notiert. Damit war über den gesamten Versuchszeitraum eine Überwachung der Anästhesie gegeben.

Blutgasanalyse und Bestimmung von Schädigungsparametern

Abhängig vom jeweiligen Versuchsverlauf wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten Blutproben entnommen. Dazu wurde ein 2 ml Probennehmer zur arteriellen Blutprobenentnahme (PICO50), welcher 80 IU elektrolyt-kompensiertes Heparin enthielt, mit 0,5 ml Blut gefüllt. Im Anschluss der Blutentnahme wurde der Katheter mit

0,5 ml NaCl 0,9% gespült, um den Flüssigkeitsverlust zu kompensieren und um die Katheter-Durchgängigkeit aufrecht zu erhalten. 95 µl des gewonnenen Blutes wurden mit Hilfe eines Blutgasanalysegerätes analysiert um die Parameter pH-Wert (pH), Sauerstoff- und Kohlenstoffdioxidpartialdruck (pO₂ und pCO₂), arterielle O₂-Sättigung, Hämoglobingehalt (Hb), Hämatokrit (Hkt), Base Excess (BE), Standardbicarbonat (BE und Standardbicarbonat nicht bei Hämodilution) und die Elektrolytkonzentrationen (K⁺, Na⁺, Ca²⁺, Cl⁻) zu bestimmen. Außerdem wurden die metabolischen Parameter Glukose und Laktat durch das Blutgasanalysegerät gemessen.

Aus dem, nach der Blutgasanalyse, verbliebenen Blut wurde durch 5-minütige Zentrifugation mit 4500 x g Blutplasma gewonnen. Das Blutplasma wurde zur Messung von Enzymaktivitäten am selben Tag bei 4°C gelagert oder für spätere Messungen bei -80°C aufbewahrt. Die Bestimmung von Enzymaktivitäten gab Aufschluss über eventuelle Organschäden, dabei wurden die Leberenzyme Alanin-Aminotransferase (ALAT) und Aspartat-Aminotransferase (ASAT) als Indikator für Leberschäden (wobei ASAT im speziellen für die Anzeige von Schäden der Mitochondrien steht), Creatinin als Nierenschädigungsparameter, die Creatin-Kinase (CK) als Schädigungsparameter für Herz- und Skelettmuskelzellen sowie die Laktatdehydrogenase (LDH) als global auffindbarer, unspezifischer Schädigungsparameter diverser Gewebe gemessen. Alle Enzymaktivitäten wurden durch ein automatisiertes Analysesystem gemessen.

Euthanasie und Organentnahme

Im Versuchsdesign der toxischen Untersuchung, sowie für die Bestimmung der Halbwertszeit erfolgte am Ende des Versuchs die Tötung der Tiere durch Organentnahme in tiefer Narkose (Isofluran 4%). Im Versuch der Hämodilution verstarben die Tiere als Folge des Versuchsdesigns. Zur Organentnahme wurde eine ca. 5 cm lange mediane Laparotomie entlang der *Linea alba* durchgeführt und der Bauchraum eröffnet. Über die Bauchraumöffnung wurde folgend der Dünndarm entnommen. Der Dünndarm wurde dann in etwa zehn gleich große Segmente geteilt, wobei Segment IV für die histologische Untersuchung aufgearbeitet wurde. Darauffolgend wurde der rechte mittlere Leberlappen (*Lobus medialis dexter*), die Nieren sowie die Milz über den geöffneten Bauchraum entnommen. Im Anschluss erfolgte eine mediane Halsinzision, um die Trachea frei präparieren zu können. Über eine Tracheotomie wurde eine Kanüle in diese eingelegt und mit einer Ligatur fixiert. Über die Kanüle konnte unter Zuhilfenahme einer 5 ml Spritze Luft in die Lunge injiziert

werden um ein Kollabieren oder Einblutungen in die Lunge während der Entnahme zu verhindern. Im Folgenden wurden Lunge sowie Herz zusammen entnommen und *ex situ* voneinander separiert. Die Organe wurden bis zur histopathologischen Aufarbeitung, aber wenigstens für 24 Stunden in 4%igem neutral gepuffertem Formalin fixiert.

3.2.8.2 Untersuchung potenziell toxischer Effekte

Zur Bestimmung möglicher toxischer Effekte wurden Kapselsuspensionen mit 64 Vol% (Standardsynthese) sowie optimierte Kapseln (siehe Abschnitt 3.2.6) intravenös infundiert. Als Kontrolle wurde HSA 5% infundiert. Die genauen Zusammensetzungen der untersuchten Lösungen sind in Tabelle 12 dargestellt. Je Versuchsgruppe wurden acht Tiere eingesetzt. Der allgemeine Operationsablauf ist in Abschnitt 3.2.8.1 beschrieben. Nach der Katheterisierung der Gefäße folgte, wie in Abbildung 3 schematisch dargestellt, eine 30-minütige Stabilisierungsphase. Nach dieser Phase wurde die jeweilige Kapselsuspension (64 Vol%, optimierte Kapseln) bzw. HSA 5% als Kontrolle über einen Zeitraum von 30 Minuten in die *Vena femoralis* infundiert. Dazu wurde in allen Versuchen ein Infusionsvolumen von 10 ml/kg KGW verwendet. Zur weiteren Standardisierung wurde eine Katheterlänge von 20 cm eingesetzt, welcher nach Infusionsende mit 0,5 ml NaCl 0,9% gespült wurde. Es folgte eine Nachbeobachtungszeit von 2,5 Stunden. Wie im schematischen Versuchsablauf in Abbildung 3 gezeigt, wurden über den gesamten Operationsverlauf Blutgasanalysen genommen und Schädigungsparameter bestimmt.

Tabelle 12: Bei der Untersuchung potenziell toxischer Effekte eingesetzte Lösungen und deren Zusammensetzung.

Lösung	Zusammensetzung
HSA 5% (Kontrolle)	Infusionslösung der Firma Baxter: Human Albumin 50 g/L 0,75 mM NaCl 130-160 mM Natriumcaprylat 4 mM Natriumacetyltryptophanoat 4 mM
optimierte Kapseln	Kapseln aus optimierter Synthese in HSA 5% (siehe oben)
64 Vol%	64 Vol% Kapseln aus Standardsynthese in HSA 5% (siehe oben)

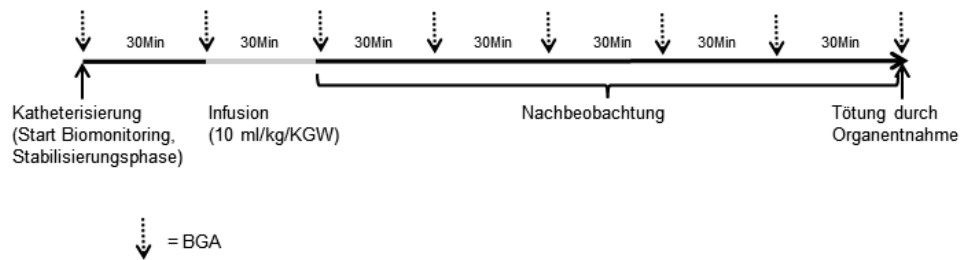


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Operationsverlaufs zur Untersuchung potentiell toxischer Effekte. BGA=Blutgasanalyse

3.2.8.3 Bestimmung der intravasalen Halbwertszeit

Die intravasale Halbwertszeit von optimierten Kapseln wurde in Kooperation mit dem Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Christian Mayer (Institut für Physikalische Chemie, Universität Duisburg-Essen) bestimmt. Die genaue Zusammensetzung der untersuchten Lösung ist in Tabelle 13 dargestellt.

Tabelle 13: Bei der Bestimmung der intravasalen Halbwertszeit eingesetzte Lösung und deren Zusammensetzung.

Lösung	Zusammensetzung
optimierte Kapseln	Kapseln aus optimierter Synthese in HSA 5% Infusionslösung der Firma Baxter:
	Human Albumin 50 g/L 0,75 mM
	NaCl 130-160 mM
	Natriumcaprylat 4 mM
	Natriumacetyltryptophanoat 4 mM

Prinzip der Messung

Die intravasale Verweildauer der Kapseln ist abhängig von deren Abbau bzw. deren Aufnahme in Makrophagen und Einlagerung in Organe. Der Abbau der Kapseln kann direkt nach Infusion im Gefäßsystem beginnen, so dass PFD frei wird und aufgrund seines hohen Dampfdruckes direkt über die Lunge abgeatmet wird. Außerdem können die Kapseln auch vom retikuloendothelialen System aufgenommen werden und in Organen oder Geweben eingelagert werden. Beide Vorgänge führen zu einer intravasalen Abnahme von PFD. Somit stellt die Abnahme der PFD-Konzentration im Blut die intravasale Halbwertszeit der Kapseln dar. Mithilfe der Fluor-

Kernspinresonanzspektroskopie (^{19}F -NMR-Spektroskopie) wurde der Gehalt an PFD gemessen und daraus die intravasale Halbwertszeit der Kapseln berechnet.

Versuchsablauf

Zur Bestimmung der intravasalen Halbwertszeit wurden optimierte Kapseln intravenös infundiert. Es wurden drei Tiere eingesetzt. Der allgemeine Operationsablauf ist in Abschnitt 3.2.8.1 beschrieben. Nach der Katheterisierung der Gefäße folgte, wie in Abbildung 4 schematisch dargestellt, eine 30-minütige Stabilisierungsphase. Nach dieser Phase wurde die Kapselsuspension mittels einer Infusionspumpe über einen Zeitraum von 30 Minuten in die *Vena femoralis* infundiert. Dazu wurde in allen Versuchen ein Infusionsvolumen von 10 ml/kg KGW verwendet. Zur weiteren Standardisierung wurde eine Katheterlänge von 20 cm eingesetzt, welcher nach Infusionsende mit 0,5 ml NaCl 0,9% gespült wurde. Es folgte eine Nachbeobachtungszeit von 2,5 Stunden. Die Blutentnahmen zur Bestimmung der intravasalen Halbwertszeit der Kapseln erfolgte, wie in Abbildung 4 schematisch dargestellt, zu Beginn sowie am Ende des Infusionszeitraums und im Folgenden alle 60 Minuten über einen Zeitraum von drei Stunden. Die entnommenen Blutproben wurden im Anschluss bei -80°C gelagert. Die Messung und Berechnung des PFD-Gehaltes erfolgte im Institut für Physikalische Chemie im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Mayer. Daraus wurde die intravasale Halbwertszeit der Kapseln berechnet.

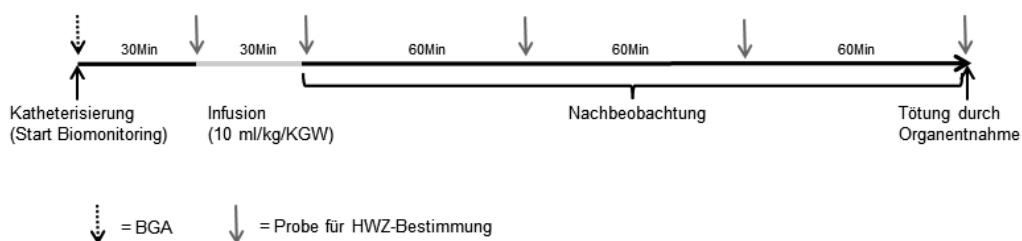


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Operationsverlaufs zur Bestimmung der intravasalen Halbwertszeit. BGA=Blutgasanalyse

3.2.8.4 Hämodilution

Der allgemeine Operationsablauf ist in Abschnitt 3.2.8.1 beschrieben. Wie in Abbildung 5 schematisch dargestellt folgte nach der Katheterisierung der Gefäße eine 20-minütige Stabilisierungsphase, in der jeweils jede zehnte Minute ein Biomonitoring

stattgefunden hat. Nach dieser Phase wurde mit dem ersten der elf drei-minütigen normovolämen Dilutionsschritte begonnen. Während der Dilution wurden insgesamt 3 ml Blut mit einer Geschwindigkeit von 1 ml/Minute über die *Arteria femoralis* entnommen. Dabei wurden 0,5 ml Blut mit Hilfe eines 2 ml Probennehmers zur arteriellen Blutprobenentnahme (PICO50), welcher mit 80 IU elektrolyt-kompensiertem Heparin befüllt war, entnommen und daraus eine Blutgasanalyse sowie Schädigungsparameter bestimmt. Die 2,5 ml Restvolumen wurden mit einer 3 ml Spritze entnommen. Simultan dazu erfolgte die intravenöse Infusion von HSA 5% (Kontrolle) oder 12 Vol% Kapseln über 3 Minuten mit einer Geschwindigkeit von 1ml/Minute. Die genauen Zusammensetzungen der Lösungen sind in Tabelle 14 dargestellt. Nach der drei-minütigen Dilution folgte eine fünfzehn-minütige Dilutionspause, die zur Stabilisierung des Kreislaufes diente. Die Dilutionsschritte wurden insgesamt elf Mal durchgeführt, so dass final in beiden Gruppen ein Hämatokrit von $5 \pm 1\%$ erreicht wurde (Abbildung 6). Jeder Dilutionsschritt wurde von einem Biomonitoring begleitet. Nach dem elften Dilutionsschritt wurden die Tiere bis zu ihrem Versterben weiter beobachtet, wobei jede zehnte Minute ein Biomonitoring sowie jede dreißigste Minute die Entnahme von 0,3 ml Blut zur Bestimmung einer Blutgasanalyse und zur Bestimmung der Schädigungsparameter erfolgte. In dem Versuch wurden zwei Versuchsgruppen (HSA 5% (Kontrolle) sowie 12 Vol% Kapseln) mit jeweils acht Tieren untersucht. Die Tiere zeigten als Folge der Hämodilution ein massives Erblassen sämtlicher sichtbarer Hautareale sowie der äußeren Augenhaut (Abbildung 7).

Tabelle 14: Bei der Hämodilution eingesetzte Lösungen und deren Zusammensetzung.

Lösung	Zusammensetzung
HSA 5% (Kontrolle)	Infusionslösung der Firma Baxter:
	Human Albumin 50 g/L 0,75 mM
	NaCl 130-160 mM
	Natriumcaprylat 4 mM
	Natriumacetyltryptophanoat 4 mM
	+ Glukose 10 mM
12 Vol%	12 Vol% Kapseln aus Standardsynthese in HSA 5% + 10 mM Glukose (siehe oben)

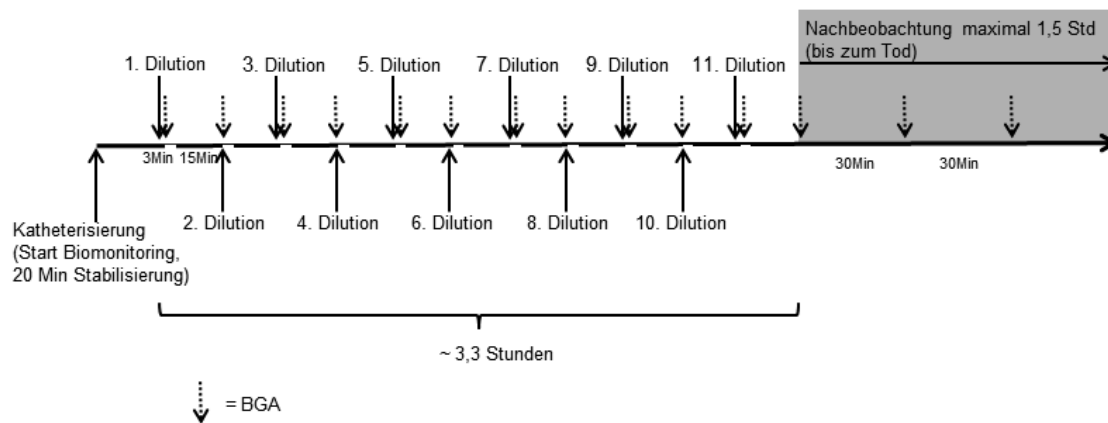


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Operationsverlaufs der Hämodilution. BGA=Blutgasanalyse.

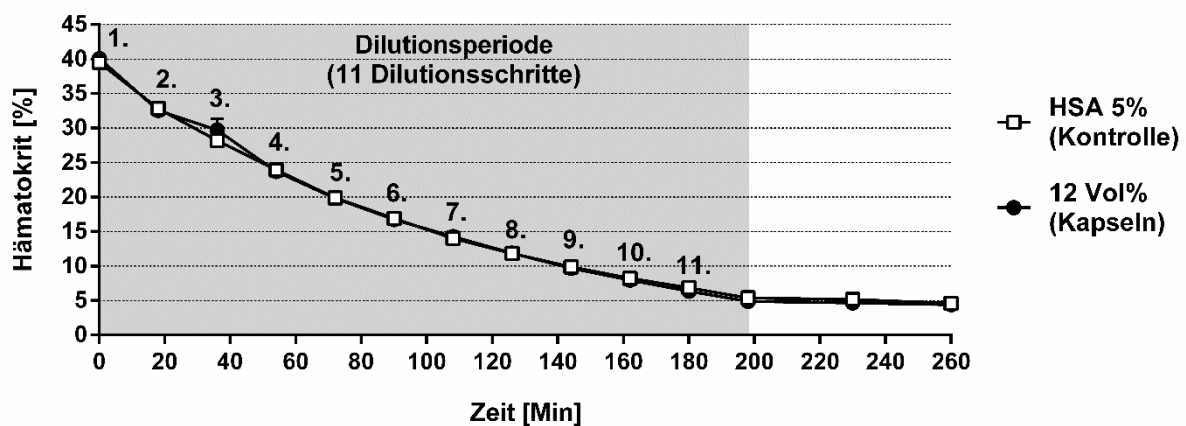


Abbildung 6: Verlauf des Hämatokrits während der Hämodilution. Nach elf Dilutionsschritten erreichten die Tiere beider Gruppen einen finalen Hämatokrit von 5%, welcher bis zum Versuchsende stabil blieb. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM aus 8 Tieren je Versuchsgruppe.



Abbildung 7: Veränderung der Haut- und Augenfärbung während der Hämodilution. Die Tiere beider Gruppen zeigten als Folge der Hämodilution eine massive Verblassung aller sichtbaren Hautareale sowie der Augen.

3.2.9 Histologische Untersuchungen

Zur Beurteilung von möglichen Gewebsschädigungen wurden die entnommenen Organe der toxischen Untersuchung histopathologisch ausgewertet. Dazu wurden die in Formalin fixierten Organe, im Institut für Pathologie und Neuropathologie des Universitätsklinikums Essen, durch Einbringen in Alkoholreihen entwässert. Im Anschluss wurden die entwässerten Organe in Paraffin eingebettet und aus den Paraffinblöcken mit Hilfe eines Schlittenmikrotoms 2-3 µm dünne Schnittpräparate angefertigt. Die Schnitte wurden dann auf Objektträger aufgelegt und bis zur Färbung bei Raumtemperatur gelagert.

3.2.9.1 Hämatoxylin-Eosin Färbung

Alle entnommenen Organe wurden mittels Hämatoxylin und Eosin eingefärbt. Das basische Hämatoxylin (H) färbt basophile Gewebsbestandteile blau ein, dazu zählen z. B. Nukleinsäuren und Glykane. Eosin (E) färbt azophile Komponenten rot, dazu gehören z. B. Kollagen und Mitochondrien. Die Farbstoffkombination (HE) erzeugt blau-violette Zellkerne, rot-violettes Zytoplasma und rote Kollagenfasern. Für die Färbung wurden die vorbereiteten Objektträger zur Entfernung des Paraffins 30 Minuten bei 65°C im Brutschrank gelagert. Des Weiteren folgte zweimal eine jeweils zehn-minütige Einbringung der Schnitte in ein Gefäß mit Xylol Substitute sowie, zur Hydratisierung der Schnitte, das Einbringen in Gefäße mit fallender Ethanolkonzentration (zweimal 5 Minuten 100% Ethanol (EtOH), 5 Minuten 96% EtOH und fünf Minuten 70% EtOH). Im Anschluss wurden die Schnitte für zehn Minuten in Hämatoxylin getränkt. Um Hämatoxylin Überstände zu entfernen, wurden die Schnitte fünf Minuten mit lauwarmem Leitungswasser gewässert bevor sie für drei Minuten mit Eosin gefärbt wurden. Die Eosin Überstände wurden im Anschluss durch fünf minütiges Wässern entfernt. Dann wurden die Schnitte in Gefäße mit aufsteigender EtOH-Konzentration eingebracht (dreimal eintauchen in 70% EtOH, fünf Minuten 96% EtOH und zweimal jeweils zehn Minuten 100% EtOH) bevor sie abschließend zweimal für je zehn Minuten in Xylol Substitute eingetaucht wurden. Zur Mikroskopie wurden die Schnitte mit Mountingmedium bedeckt und mit einem Deckglas verschlossen.

3.2.9.2 Makrophagen Färbung der Milz

Zur detaillierteren Untersuchung der Milz wurden die Makrophagen dieser Schnitte angefärbt. Hierzu wurden die Schnitte wie bereits bei der HE-Färbung erläutert, zunächst von Paraffin befreit. Nach dem letzten EtOH-Schritt erfolgte eine drei-

minütige Hydratisierung der Schnitte. Dann wurden sie für 15 Minuten in 95°C Citratpuffer eingebracht, um die Proteine zu demaskieren. Im Anschluss erfolgte eine 25-minütige Kühlung der Schnitte in einem Eisbad. Darauffolgend wurden die Schnitte für drei Minuten in Phosphat gepufferter Salzlösung mit 0,5% Tween 20 (PBST) gewaschen bevor sie für zehn Minuten in eine 3%ige H₂O₂-Lösung eingebracht wurden. Die H₂O₂-Lösung diente zur Absättigung aller vorhandenen Peroxidasen. Danach wurden die Schnitte wiederum für drei Minuten in PBST gebracht. Nun wurden die zu färbenden Gewebeteile mittels eines Lipidstiftes eingerahmt. Dann erfolgte ein Proteinblock für eine Stunde bei Raumtemperatur, indem einige Tropfen der Proteinblocklösung (Dako) auf die abgegrenzten Gewebeteile aufgebracht wurden. Im Anschluss wurden je Gewebeteil 100 µl des Antikörpers gegen Makrophagen (1:1000 in PBST) aufgetragen und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am darauf folgenden Tag erfolgte eine dreifache, jeweils zehn Minuten andauernde Waschung in PBST bevor 100 µl des zweiten biotinylierten Antikörpers (1:5000 in PBST) für 30 Minuten bei Raumtemperatur in die Lipidgrenze eingebracht wurden. Folgend wurden die Schnitte dreimal für je fünf Minuten in PBS gewaschen. Mit Hilfe eines Kits (VECTASTAIN® Elite ABC Kit, Vector Laboratories) zur farblichen Darstellung des zweiten Antikörpers konnten die Makrophagen sichtbar gemacht werden. Dazu wurden 30 Minuten vor Verwendung 100 µl Reagenz A (Avidin) zu 5 ml PBS gegeben und homogenisiert. Direkt im Anschluss wurden 100 µl Reagenz B (biotinylierte Peroxidase H) zu der angesetzten Lösung gegeben und vermengt. Etwa 100 µl der gebrauchsfertigen Lösung wurden dann auf die Schnitte aufgetragen und für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der entstandene Komplex aus Avidin (Reagenz A) und biotinylierter Peroxidase (Reagenz B) band nun an den biotinylierten zweiten Antikörper. Darauffolgend wurden die Schnitte dreimal für je fünf Minuten in PBS gewaschen. Auf die Schnitte wurde dann für fünf Minuten, bei Raumtemperatur ein Peroxidase Substrat (Diaminobenzidin (DAB) Quanto, Thermo scientific) aufgetragen, welches folgend in einen braun-grauen Farbstoff überführt wurde. Danach wurden die Schnitte zweimal kurz in VE-Wasser gewaschen und es folgte, wie bereits in der HE-Färbung beschrieben, eine Färbung mit Hämatoxylin. Dieser zusätzliche Färbeschritt diente als Hilfestellung für eine bessere Orientierung bei der späteren Mikroskopie. Wie bei der HE-Färbung wurden die Schnitte final in Gefäße mit aufsteigender EtOH-Konzentration eingebracht bevor sie abschließend zweimal für je zehn Minuten in Xylol

Substitute eingetaucht wurden. Zur Mikroskopie wurden die Schnitte mit Mountingmedium bedeckt und mit einem Deckglas verschlossen.

3.2.10 Herzperfusion nach Langendorff

Die Versuche der Herzperfusion nach Langendorff wurden im Physiologischen Institut der Justus-Liebig-Universität im Arbeitskreis von Prof. Dr. Klaus Dieter Schlüter in Gießen durchgeführt. Alle Versuche waren von den lokalen Behörden genehmigt. Je eine von insgesamt 26 Ratten wurde zur Anästhesie in einen Behälter mit 4-5% Isofluran gebracht. Nach Erreichen eines tiefen Anästhesiestadiums wurde das jeweilige Tier durch zervikale Dislokation getötet und das Abdomen geöffnet. Es folgte das Durchtrennen des Zwerchfells und die weitere Öffnung des Thorax. Über die Thoraxöffnung erfolgte dann die gemeinsame Entnahme des Herzens und der Lunge. Die Organe wurden unmittelbar in eine Petrischale mit 4°C NaCl 0,9% gebracht. Dadurch wurde der Muskeltonus gestoppt und sämtliche Stoffwechselprozesse verlangsamt, um so einen Ischämie-Reperfusionsschaden weitestgehend zu reduzieren. Es folgte das Abtrennen der Lunge und das frei Präparieren der *Aorta ascendens*. Daraufhin wurde das Herz an einer Perfusionskanüle aus Edelstahl (Durchmesser 1,6 mm), die sich in der Langendorff-Perfusionsanlage befand, zunächst mit einer Klemme dann final mit Ligaturen befestigt. Parallel zur Befestigung des Herzens erfolgte bereits die Perfusion mit 37°C modifiziertem KH-Puffer mit einem beginnenden Perfusionsfluss von zunächst 2,5 ml/Minute.

Das Prinzip der retrograden Perfusion

In Abbildung 8 A ist schematisch das Herz dargestellt. Unter physiologischen Bedingungen würde das Blut den linken Ventrikel des Herzens über die Aorta in Richtung Körperkreislauf verlassen (Abbildung 8 B, roter Pfeil). Während der Herzperfusion nach Langendorff wurde in diesen Teil der Aorta eine Perfusionskanüle eingebracht (Abbildung 8 C). Über diese Perfusionskanüle konnte das jeweilige Perfusat (modifizierter KH-Puffer oder Kapselsuspension in modifiziertem KH-Puffer) verabreicht werden (Abbildung 8 D, blauer Pfeil). Als Folge der retrograden Perfusion verschloss sich die Aortenklappe (Abbildung 8 E, orange Markierung), welche unter physiologischen Bedingungen einen Rückstrom des Blutes verhindern soll. Das Perfusat wurde dann über die linke und rechte Koronararterie in die Myokardkoronarien abgeleitet (Abbildung 8 F, blaue Pfeile), womit die Versorgung des

Myokards mit Sauerstoff und Elektrolyten sichergestellt war. Abbildung 9 C zeigt das Herz in der Langendorff Perfusionsanlage.

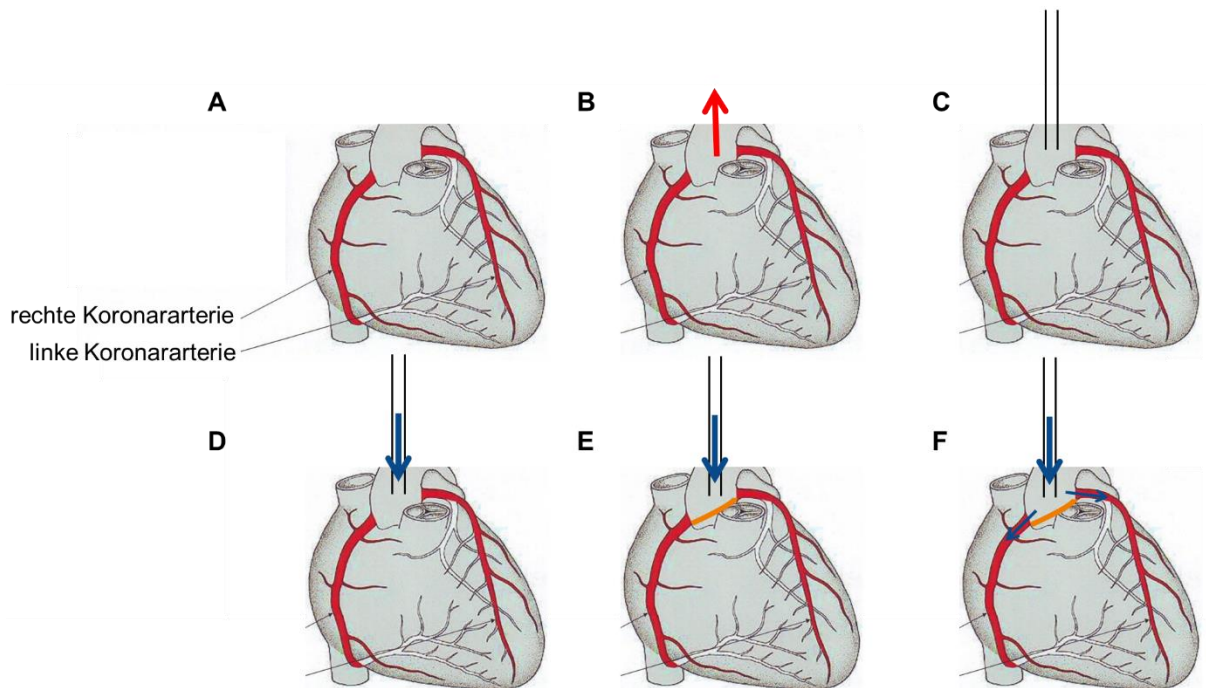


Abbildung 8: Das Herz in der Langendorff-Perfusion A Schematische Darstellung des Herzens B roter Pfeil symbolisiert die physiologische Flussrichtung des Blutes in die Aorta C Perfusionskanüle in Aorta D blauer Pfeil stellt retrograde Flussrichtung des Perfusats dar E Aortenklappe (orange) verschließt sich aufgrund der retrograden Perfusion F Perfusat (blaue Pfeile) wird über rechte und linke Koronararterie in die Myokardkoronarien geleitet. Abbildung modifiziert nach [63].

Aufbau der Langendorff-Perfusionsanlage

In Abbildung 9 A (schematisch) und 9 B ist der Aufbau der Langendorff-Perfusionsanlage abgebildet. In den Reservoirs wurden die Perfusate (modifizierter KH-Puffer oder Kapselsuspension) mit Carbogen® (95% O₂, 5% CO₂) begast. Eine Rollerpumpe beförderte das Perfusat in einen Wärmetauscher, indem es auf 37°C erwärmt wurde. Über die Rollerpumpe war es zudem möglich, die Flussgeschwindigkeit und damit die Perfusionsgeschwindigkeit variabel einzustellen. Zwischengeschaltete Vierwegehähne ermöglichten das Zuführen verschiedener Perfusionslösungen. Nachdem das Perfusat den Wärmetauscher durchlaufen hatte gelangte es in die Kanüle an der das Herz befestigt war. Die Kanüle war mit einem Druckaufnehmer versehen. Das Herz befand sich in einer auf 37°C erwärmten und verschlossenen Kammer. In den linken Ventrikel wurde ein Latexballon eingebracht, der mit einem Druckaufnehmer versehen war. Über den Latexballon im linken Ventrikel

war es, durch Zugabe von *aqua bidest* möglich, den diastolischen Druck des Herzens auf 11-12 mmHg einzustellen und über den gesamten Versuch konstant zu halten. Die Druckaufnehmer zeichneten die Herzfrequenz, den systolischen sowie den diastolischen Druck auf. Die von den Druckaufnehmern gemessenen Impulse wurden über einen Analog-Digital-Wandler zu einem PC übermittelt.

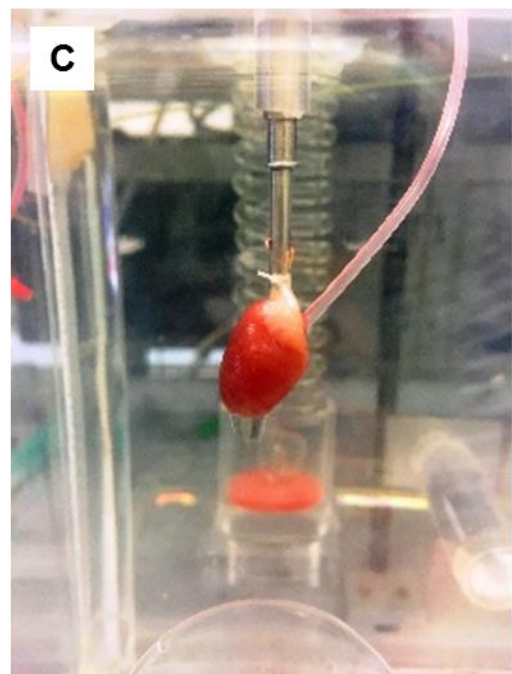
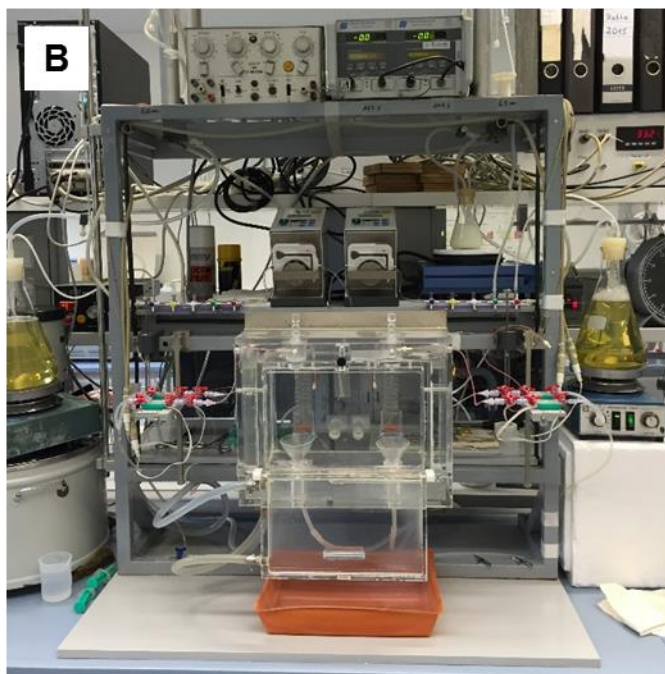
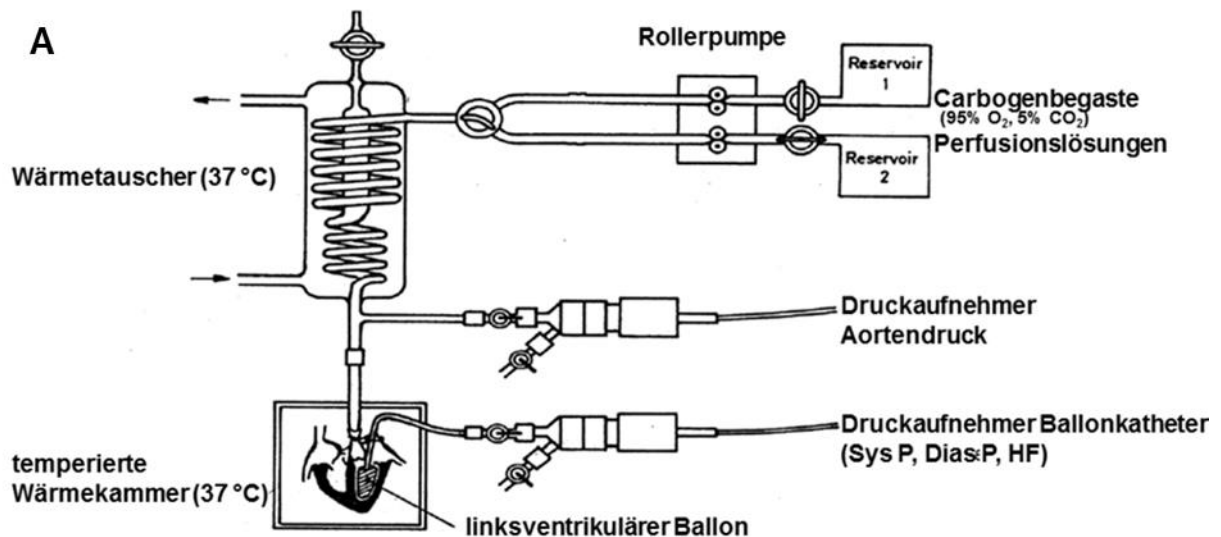


Abbildung 9: Aufbau der Langendorff-Perfusionsanlage. A Schematische Darstellung des Aufbaus der Perfusionsanlage nach Langendorff (modifiziert nach [64]), B verwendete Perfusionsanlage nach Langendorff, C Herz in Perfusionsanlage fixiert.

Erfasste Parameter

Über den gesamten Versuchsverlauf wurden physiologische Parameter erfasst: der Perfusionsfluss, der Perfusionsdruck, der diastolische Druck sowie der systolische Druck. Aus den erfassten Daten konnte der links ventrikulär entwickelte Druck (LVDP), welcher der Differenz zwischen systolischem und diastolischem Druck entspricht sowie das „Rate Pressure Product“ (RPP), welches aus der Multiplikation von LVDP und Herzfrequenz entsteht, berechnet werden. Diese Parameter gaben Aufschluss über die Vitalität der Langendorff Herzen.

Versuchsdurchführung

Nach der Fixierung der Herzen in der Langendorff Perfusionsanlage begann die Stabilisierungsphase, in welcher der anfängliche Perfusionsfluss von 2,5 ml/Minute auf ca. 10 ml/Minute allmählich erhöht wurde, um einen finalen Perfusionsdruck (erfasst durch Druckaufnehmer in der Kanüle oberhalb der Aorta) von 50 mmHg zu erzeugen. Ebenso wurde in dieser Phase der Latexballon im linken Ventrikel mit *aqua bidest* gefüllt, um einen diastolischen Druck von 11-12 mmHg zu erzeugen. Nach ca. 10 Minuten Stabilisierungsphase waren die zu erfassenden Parameter stabil, so dass der jeweilige Versuch gestartet werden konnte. Die genauen Zusammensetzungen der untersuchten Lösungen sind in Tabelle 15 dargestellt.

Tabelle 15: Bei der isolierten Organperfusion nach Langendorff untersuchte Lösungen und deren Zusammensetzung.

Lösung	Zusammensetzung
Modifizierter KH-Puffer (Kontrolle)	NaCl 105 mM KCl 2,7 mM NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O 1,5 mM MgCl ₂ x 6H ₂ O 2,0 mM Glukose 5,0 mM CaCl ₂ x 2H ₂ O 3,6 mM NaHCO ₃ 30 mM Bovines Serum Albumin (5%) 0,75 mM in <i>aqua bidest</i>
2 Vol%	2 Vol% Kapseln aus der Standardsynthese in modifiziertem KH-Puffer (siehe oben)
4 Vol%	4 Vol% Kapseln aus der Standardsynthese in modifiziertem KH-Puffer (siehe oben)
6 Vol%	6 Vol% Kapseln aus der Standardsynthese in modifiziertem KH-Puffer (siehe oben)

3.2.10.1 Dosis Determination

Zur initialen Bestimmung der optimalen Dosis wurden 2, 4 sowie 6 Vol%ige Kapselsuspensionen zur Perfusion eingesetzt. Es wurden zwei Herzen parallel in der Perfusionsanlage perfundiert, wobei ein Herz über den gesamten Versuchsverlauf mit modifiziertem KH-Puffer (Kontrollherz) und das andere über Teile des Versuchs mit den Kapselsuspensionen (Kapselherz) perfundiert wurde. Nach der Stabilisierungsphase mit einem Fluss von 10 ml/Minute (100% Fluss) und modifiziertem KH-Puffer in beiden Herzen wurde der Fluss um 50% reduziert um eine moderate Ischämie zu initiieren. Nach weiteren 10 Minuten Stabilisierungsphase mit 50% Fluss erfolgte die erste Kapselperfusion mit 2 Vol%iger Kapselsuspension im Kapselherz für 10 Minuten. Darauf folgte das Auswaschen der Kapselsuspension durch die Perfusion mit modifiziertem KH-Puffer für 10 Minuten. Im Anschluss wurde das Kapselherz für 10 Minuten mit 4 Vol%iger Kapselsuspension perfundiert. Danach wurde die Kapselsuspension durch eine 10-minütige Perfusion mit modifiziertem KH-Puffer ausgewaschen. Eine 10-minütige Perfusion mit 6 Vol%iger Kapselsuspension folgte, bevor eine finale Auswaschung mit modifiziertem KH-Puffer durchgeführt wurde.

3.2.10.2 Repetition

In diesem Versuch wurden sechs Kontrollherzen mit KH-Puffer sowie sechs Kapselherzen wiederholt mit 4 Vol%iger Kapselsuspension perfundiert. Dazu wurde, nach der 10-minütigen Stabilisierungsphase mit 100% Flussgeschwindigkeit und modifiziertem KH-Puffer als Perfusat in beiden Herzen, der Fluss um 50% reduziert, um eine moderate Ischämie einzuleiten. Nach 10 Minuten der moderaten Ischämie erfolgte die Behandlung mit 4 Vol%iger Kapselsuspension für 10 Minuten im Kapselherz, wohingegen das Kontrollherz weiterhin mit modifiziertem KH-Puffer perfundiert wurde. Nach einer 10-minütigen Periode des Auswaschens wurde die Perfusion mit 4 Vol%iger Kapselsuspension wiederholt.

3.2.10.3 Massive Flussreduktion

In diesem Versuch wurde der Fluss von 100% schrittweise auf 20% reduziert bevor final der initiale Fluss von 100% wiederhergestellt wurde. Dazu wurden sechs Kontrollherzen sowie sechs Kapselherzen perfundiert. Während der 10-minütigen Stabilisierungsphase wurde das Kontrollherz mit modifiziertem KH-Puffer und das Kapselherz mit 4 Vol%iger Kapselsuspension sowie einem Fluss von 100%

perfundiert. Jede zehnte Minute wurde der Fluss schrittweise um 20% auf 80%, 60%, 40% und 20% reduziert. Am Ende des Versuchs wurde der initiale Fluss von 100% für weitere 10 Minuten wiederhergestellt.

3.2.11 Statistik

Die im Ergebnisabschnitt dargestellten Daten aus den Tierversuchen (Abschnitt 4.4 Untersuchung potenziell toxischer Effekte, Abschnitt 4.5 Bestimmung der intravasalen Halbwertszeit und Abschnitt 4.8 Hämodilution) beinhalten die Mittelwerte der jeweiligen Gruppe \pm SEM (Standardfehler; *Standard Error of the Mean*). Die statistische Signifikanz zwischen den Versuchsgruppen und den Kontrollgruppen wurde mittels *two-way ANOVA* für wiederkehrende Messwerte und angeschlossener *Dunnett's post-hoc* Analyse ermittelt. Als statistisch signifikant galt eine Überschreitungswahrscheinlichkeit (p-Wert) von $* p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Die dargestellten Daten der Sauerstofftransportkapazität (Abschnitt 4.7.1) zeigen die Mittelwerte der jeweiligen Gruppe \pm SD (Standardabweichung; *Standard Deviation*). Die statistische Signifikanz zwischen der Versuchsgruppe und der Kontrollgruppe wurde mittels *unpaired T-Test* ermittelt. Als statistisch signifikant galt eine Überschreitungswahrscheinlichkeit (p-Wert) von $* p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Die Daten der Herzperfusion nach Langendorff (Abschnitt 4.7.2, 4.7.3 und 4.7.4) zeigen die Mittelwerte der jeweiligen Gruppe \pm SD (Standardabweichung; *Standard Deviation*). Die statistische Signifikanz zwischen den Versuchsgruppen und der Kontrollgruppen wurde mittels *multiple T-Test* und angeschlossener *Holm-Sidak post-hoc* Analyse ermittelt. Als statistisch signifikant galt eine Überschreitungswahrscheinlichkeit (p-Wert) von $* p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Alle Analysen wurden mit Software (Graph Pad Prism 6.05) der Firma Graph Pad Software (La Jolla, USA) durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Kapselform

Abbildung 10 zeigt die Ergebnisse der Untersuchung zur Form der Kapseln. Dabei war bei der Betrachtung der Aufnahmen der Laser Scanning Mikroskopie (Abbildung 10 A) eine kreisrunde Struktur mit farblosem Innenraum zu erkennen. Der Durchmesser der Kapseln betrug, anhand der Aufnahmen, eine Größe von 1,5-2 μm . Die Bilder der Rasterelektronenmikroskopie (Abbildung 10 B) zeigten sphärische Körper. Die Aufnahmen der Rasterelektronenmikroskopie zeigten einen Kapseldurchmesser von etwa 0,5-1 μm .

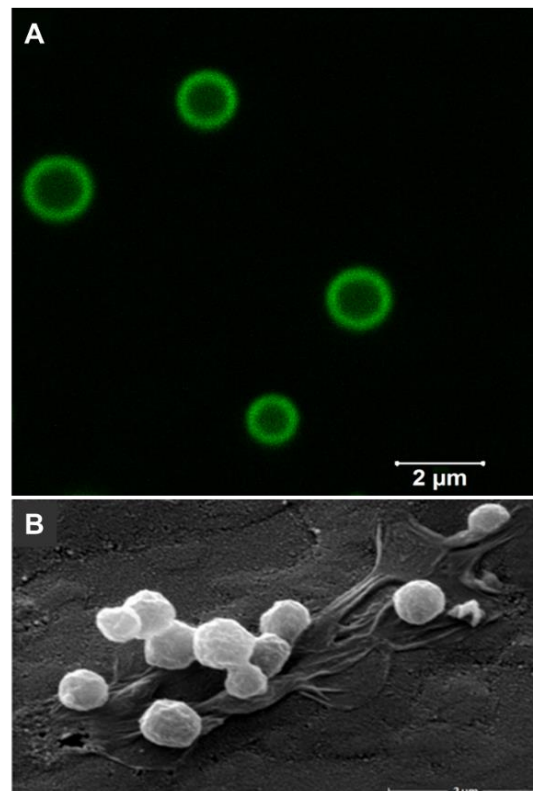


Abbildung 10: Darstellung der Kapselform. Die Kapselform gemessen mit **A** Laser Scanning Mikroskopie (Vergrößerung 8000fach) und **B** Rasterelektronenmikroskopie (Vergrößerung 15000fach).

4.2 Optimierung der Kapselsynthese

Um sowohl die Kapselgröße als auch die Größenverteilung der Standardsynthese (90 Sekunden, 100% Ultraschallintensität) zu verringern, wurde die Synthese optimiert. Abbildung 11 zeigt die Ergebnisse dieser Optimierung. Die Synthese erfolgte in einem Falcon mit 15 ml Füllvolumen (Abbildung 11, rote Balken), in einem Reagenzglas mit einem Durchmesser von 10 mm (Abbildung 11, blaue Balken) oder in einem Reagenzglas mit einem Durchmesser von 8 mm (Abbildung 11, grüne Balken). Es wurde in allen Versuchen eine Ultraschallintensität von 100% verwendet. Die Standardsynthese, in einem Falcon mit 6 ml Gesamtvolumen (5 ml HSA 5% und 1 ml PFD) und einer kontinuierlichen Beschallung über 90 Sekunden, erzeugte Kapseln mit einem mittleren Durchmesser von 1028 nm. Der geringste Kapseldurchmesser lag bei 224 nm und der maximale Kapseldurchmesser lag bei 2466 nm (Abbildung 11, mit Stern markiert). Die Kapseln mit dem kleinsten mittleren Durchmesser (252 nm) entstanden bei einer Synthese in einem Falcon mit einem Gesamtvolumen von 3 ml (2,5 ml HSA 5% und 0,5 ml PFD) und einer kontinuierlichen Beschallung von 10 Minuten. Dabei lag der maximale Durchmesser bei 692 nm und der minimale Durchmesser bei 70 nm (Abbildung 11, mit Kreis markiert). Die weiteren Synthese-Versuche erzeugten keine weitere Verringerung der Kapseldurchmesser oder der Größenverteilung (siehe Anhang Tabelle 17). Daher werden in den folgenden Versuchen die Kapseln aus einer Synthese in einem Falcon mit 3 ml Gesamtvolumen und einer Beschallungszeit von 10 Minuten als „optimierte Kapseln“ bezeichnet.

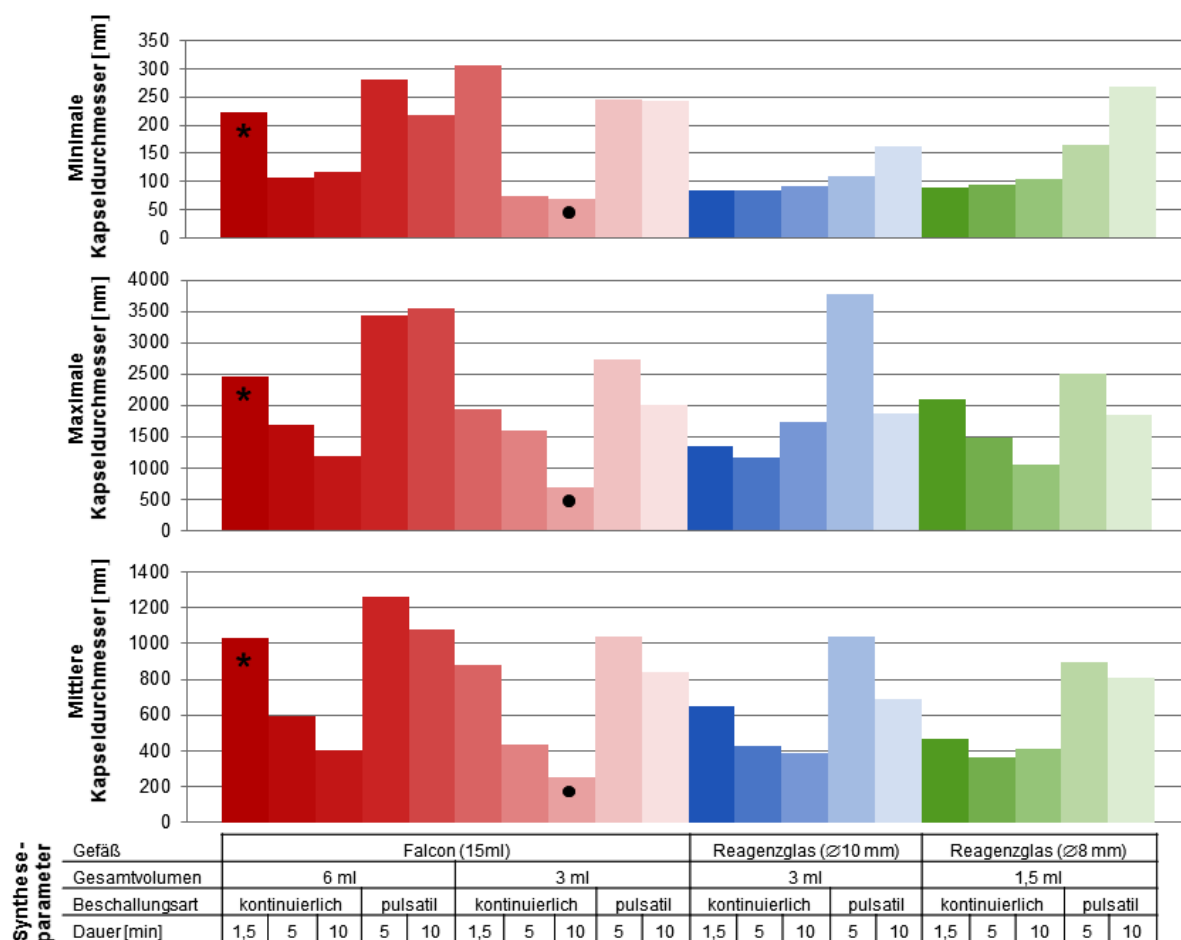


Abbildung 11: Optimierte Kapselsynthese. Kapseldurchmesser gemessen mittels DLS. Zur Synthese wurden die in der Tabelle abgebildeten Syntheseparameter verwendet. Dabei wurde als Synthesegefäß ein Falcon mit 15 ml Füllvolumen (rote Balken), ein Reagenzglas mit einem Durchmesser von 10 mm (blaue Balken) oder ein Reagenzglas mit einem Durchmesser von 8 mm (grüne Balken) verwendet. Dargestellt sind der minimal gemessene Kapseldurchmesser (oberes Diagramm), der maximal gemessene Kapseldurchmesser (mittleres Diagramm) sowie der Mittelwert der Kapseldurchmesser (unteres Diagramm). Je Optimierungsversuch wurden zwei Kapselansätze synthetisiert und gemessen. * = Standardsynthese, • = optimierte Synthese.

4.3 Bestimmung der Langzeitstabilität

In Abbildung 12 und Tabelle 16 sind die Ergebnisse der Langzeitstabilität dargestellt. Hierbei wurden die Kapseln nach der Synthese in H₂O, HSA 5% oder NaCl 0,9% überführt und die Dispersionen bei 4°C gelagert. An Tag 1 nach der Synthese zeigten die Kapseln in H₂O den geringsten mittleren Durchmesser der drei Versuchsgruppen mit 458 ± 100 nm (Abbildung 12, oben, hellgrau). An Tag 3 nach der Synthese lag der mittlere Kapseldurchmesser, der in H₂O gelagerten Kapseln, bei 450 ± 53 nm (Abbildung 12, oben, mittelgrau). An Tag 7 stieg der Durchmesser bis auf 582 ± 147 nm an (Abbildung 12, oben, schwarz). Die Kapseln in HSA 5% zeigten einen

Tag nach der Synthese den größten mittleren Durchmesser der drei Versuchsgruppen mit 707 ± 21 nm (Abbildung 12, mittig, hellgrau). An Tag 3 nach der Synthese lag der mittlere Durchmesser bei 721 ± 121 nm (Abbildung 12, mittig, mittelgrau). Sieben Tage nach der Synthese zeigten die in HSA 5% gelagerten Kapseln einen mittleren Durchmesser von 728 ± 103 nm (Abbildung 12, mittig, schwarz). Die Kapseln gelagert in NaCl 0,9% besaßen an Tag 1 nach der Synthese einen mittleren Durchmesser von 588 ± 41 nm (Abbildung 12, unten, hellgrau). Drei Tage nach der Synthese erhöhte sich der mittlere Durchmesser auf 683 ± 59 nm (Abbildung 12, unten, mittelgrau). An Tag 7 nach der Synthese erhöhte sich der mittlere Durchmesser, der in NaCl 0,9% gelagerten Kapseln weiter bis auf 768 ± 90 nm (Abbildung 12, unten, schwarz).

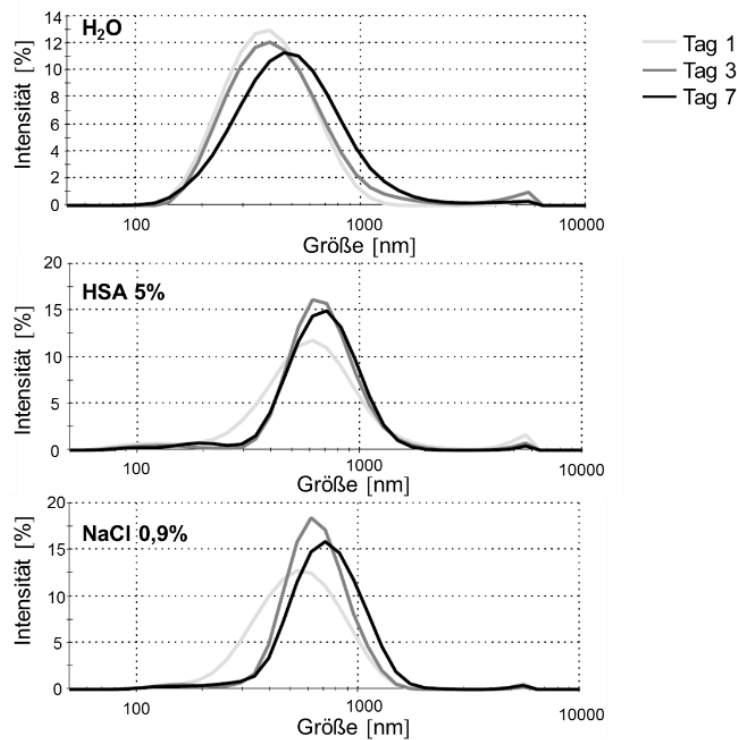


Abbildung 12: Einfluss des Lagermediums und der Lagerungszeit auf den Kapseldurchmesser. Im Anschluss an die Synthese wurden die Kapseln in das jeweilige Lagerungsmedium (H₂O, HSA 5%, NaCl 0,9%) überführt und bei 4°C gelagert. Die Größenverteilung wurde an Tag 1 (hellgrau), Tag 3 (mittelgrau) und an Tag 7 (schwarz) durch DLS gemessen. Abgebildet sind die Mittelwerte aus 6 Proben je Gruppe.

Tabelle 16 zeigt die gemessenen Zetapotenziale und Polydispersitätsindizes der gelagerten Dispersionen. Kapseln in H₂O gelagert zeigten an allen Versuchstagen das jeweils größte Zetapotenzial (Tag 1: $-29,15 \pm 3,68$ mV; Tag 3: $-18,43 \pm 1,98$ mV; Tag 7: $-17,08 \pm 2,90$ mV) und den geringsten Polydispersitätsindex

(Tag 1: $0,257 \pm 0,17$; Tag 3: $0,234 \pm 0,05$; Tag 7: $0,225 \pm 0,06$). Die Lagerung der Kapseln in NaCl 0,9% zeigte, im Vergleich zu den in H₂O gelagerten Kapseln, an allen Versuchstagen ein deutlich geringeres Zetapotenzial (Tag 1: $-7,58 \pm 0,85$ mV; Tag 3: $-7,73 \pm 0,67$ mV; Tag 7: $-6,78 \pm 0,39$ mV) sowie einen ähnlichen Polydispersitätsindex (Tag 1: $0,290 \pm 0,04$; Tag 3: $0,230 \pm 0,12$; Tag 7: $0,299 \pm 0,08$). Die Messung des Zetapotenzials der in HSA 5% gelagerten Kapseln war nicht möglich. Der Polydispersitätsindex der in HSA 5% gelagerten Kapseln lag, im Vergleich zu den in H₂O bzw. NaCl 0,9% gelagerten Kapseln, deutlich höher (Tag 1: $0,562 \pm 0,05$; Tag 3: $0,650 \pm 0,10$; Tag 7: $0,624 \pm 0,14$).

Tabelle 16: Einfluss des Lagermediums und der Lagerungszeit auf das Zetapotenzial und den Polydispersitätsindex. Im Anschluss an die Synthese wurden die Kapseln in das jeweilige Lagerungsmedium H₂O, HSA 5%, NaCl 0,9%) überführt und bei 4°C gelagert. Das Zetapotenzial und der Polidispersitätsindex wurde an Tag 1, Tag 3 und an Tag 7 nach der Synthese gemessen. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus 6 Proben je Gruppe.

	Zetapotenzial [mV]	Polidispersitätsindex
Tag 1 nach der Synthese		
Kapseln in H ₂ O	$-29,15 \pm 3,68$	$0,257 \pm 0,17$
Kapseln in NaCl 0,9%	$-7,58 \pm 0,85$	$0,290 \pm 0,04$
Kapseln in HSA 5%	Nicht messbar	$0,562 \pm 0,05$
Tag 3 nach der Synthese		
Kapseln in H ₂ O	$-18,43 \pm 1,98$	$0,234 \pm 0,05$
Kapseln in NaCl 0,9%	$-7,73 \pm 0,67$	$0,230 \pm 0,12$
Kapseln in HSA 5%	Nicht messbar	$0,650 \pm 0,10$
Tag 7 nach der Synthese		
Kapseln in H ₂ O	$-17,08 \pm 2,90$	$0,225 \pm 0,06$
Kapseln in NaCl 0,9%	$-6,78 \pm 0,39$	$0,299 \pm 0,08$
Kapseln in HSA 5%	Nicht messbar	$0,624 \pm 0,14$

4.4 Untersuchung potentiell toxischer Effekte (64 Vol% und optimierte Kapseln)

In diesem Versuch wurde Ratten 1/6 ihres Blutvolumens in einem Topload-Modell über einen Zeitraum von 30 Minuten entweder 64 Vol% Kapseln, optimierte Kapseln oder HSA 5% (Kontrolle) intravenös infundiert. Während des gesamten Versuchsverlaufs wurden systemische Parameter, metabolische Parameter,

Organschädigungsparameter sowie Elektrolyte und Hämoglobin aus den entnommenen Blutproben bestimmt. Einige Parameter zeigten dabei leichte Veränderungen.

4.4.1 Einfluss auf systemische Parameter

Während des Versuchs wurden durch das kontinuierliche Biomonitoring die systemischen Parameter mittlerer arterieller Blutdruck (MAP), Herzfrequenz, Atemfrequenz und Körperkerntemperatur aufgezeichnet (Abbildung 13). Es zeigten sich nach intravenöser Infusion der verschiedenen Lösungen keine ausgeprägten Veränderungen.

In den ersten 30 Minuten des Versuchs besaßen alle Gruppen einen MAP (Abbildung 13 A) zwischen 86 ± 2 mmHg und 101 ± 2 mmHg. 10 Minuten nach Infusionsbeginn kam es in beiden Kapselgruppen, im Vergleich zu der HSA 5% Gruppe (Kontrolle), zu einer signifikanten Abnahme des MAPs, der in der 64 Vol% Kapselgruppe bei 82 ± 4 mmHg und in der optimierten Kapselgruppe bei 84 ± 3 mmHg endete. Die Kontrollgruppe zeigte, im Vergleich zu den am Beginn des Versuchs aufgezeichneten physiologischen Werten, einen moderaten MAP Anstieg bis auf 102 ± 4 mmHg. Die Kapselgruppen hingegen zeigten einen moderaten MAP Abfall. Die MAP Werte haben sich nach dem Abfall bzw. Anstieg innerhalb von 10 Minuten wieder zwischen 82 ± 2 mmHg und 98 ± 4 mmHg stabilisiert.

Die Herzfrequenz (Abbildung 13 B) aller Gruppen lag vor der Infusion zwischen 264 ± 8 und 284 ± 7 Schläge/Minute. Die Infusion führte in allen Gruppen zu einem Anstieg der Herzfrequenz. Die Kontrollgruppe zeigte einen Anstieg von 284 ± 7 Schläge/Minute unmittelbar vor Infusionsbeginn auf 304 ± 8 Schläge/Minute am Ende der Infusionsphase und blieb bis zum Versuchsende etwa in diesem Bereich (stets unterhalb der Kapselgruppen). Die 64 Vol% Kapselgruppe zeigte 20 Minuten nach Infusionsbeginn einen, im Vergleich zur Kontrollgruppe (HSA 5%), signifikanten Anstieg der Herzfrequenz von 280 ± 10 Schläge/Minute unmittelbar vor Infusionsbeginn auf 328 ± 10 Schläge/Minute. Diese Frequenz nahm bis zu Minute 70 nach Infusionsbeginn wieder bis auf 308 ± 7 Schläge/Minute ab, um dann bis zum Versuchsende wiederholt auf 328 ± 10 Schläge/Minute anzusteigen. Die Gruppe der optimierten Kapseln zeigte 30 Minuten nach Infusionsbeginn (Ende der Infusionsphase) einen Anstieg der Herzfrequenz von 280 ± 12 Schläge/Minute unmittelbar vor der Infusion auf 320 ± 13 Schläge/Minute, welcher sich in Minute 70

nach Infusionsbeginn auf 328 ± 8 Schläge/Minute und damit (in Minute 70 und 80) im Vergleich zu Kontrollgruppe signifikant, weiter erhöhte. Diese Frequenz blieb bis zum Versuchsende in diesem Bereich.

Die Atemfrequenz (Abbildung 13 C) der Tiere lag vor der Infusion bei allen Versuchsgruppen in einem Bereich von 40 ± 2 bis 53 ± 3 Züge/Minute. Die Infusion aller verabreichten Lösungen führte zu einem Anstieg der Atemfrequenz. 20 Minuten nach Infusionsbeginn zeigten die Tiere der 64 Vol% Kapselgruppe einen, im Vergleich zur Kontrollgruppe (HSA 5%), signifikanten Anstieg der Atemfrequenz von 53 ± 3 Züge/Minute unmittelbar vor der Infusion auf 73 ± 11 Züge/Minute. Die Atemfrequenz dieser Tiere blieb bis Minute 50 nach Infusionsbeginn signifikant erhöht. Anschließend minimierte sich die Atemfrequenz bis Minute 80 wieder auf 52 ± 3 Züge/Minute. Darauffolgend stieg die Atemfrequenz der 64 Vol% Tiere erneut bis auf 63 ± 4 Züge/Minute an (100 Minuten nach Infusionsbeginn), um sich dann ab Minute 130 nach Infusionsbeginn zwischen 54 ± 4 und 51 ± 3 Züge/Minute zu stabilisieren. Die Tiere der Gruppe mit Infusion von optimierten Kapseln zeigten 30 Minuten nach Infusionsbeginn (am Infusionsende) eine moderate Erhöhung von 46 ± 3 Züge/Minute unmittelbar vor Infusionsbeginn auf 56 ± 5 Züge/Minute und erreichten damit ein ähnliches Niveau wie die Kontrollgruppe (51 ± 3 Züge/Minute). Bis zum Versuchsende blieb die Atemfrequenz der optimierten Kapselgruppe, wie auch die der Kontrollgruppe, konstant zwischen 55 ± 5 und 47 ± 3 Züge/Minute.

Die Körperkerntemperatur (Abbildung 13 D) zeigte während des gesamten Versuchsverlaufs keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen und stieg langsam von $37 \pm 0,2^\circ\text{C}$ am Versuchsbeginn auf $38 \pm 0,1^\circ\text{C}$ am Versuchsende an.

Die zur Einleitung der Narkose notwendige Isoflurankonzentration (Abbildung 13 E) lag in allen Gruppen in einem Bereich von $1,35 \pm 0,04\%$ und $1,43 \pm 0,10\%$. Als Folge der Infusion kam es in allen Gruppen zu einem erhöhten Bedarf an Isofluran, so dass die Konzentration in der Kontrollgruppe von $1,28 \pm 0,05\%$ unmittelbar vor der Infusion auf $1,63 \pm 0,08\%$ am Ende der Infusion angehoben werden musste. Im weiteren Verlauf des Versuchs musste diese Konzentration noch weitere Male angehoben werden, so dass der Kontrollgruppe final eine Isoflurankonzentration von $1,85 \pm 0,03\%$ verabreicht wurde. Die Tiere der Gruppe mit optimierten Kapseln zeigten einen Anstieg von $1,37 \pm 0,06\%$ unmittelbar vor der Infusion auf $1,55 \pm 0,09\%$ am Ende der Infusion. Auch hier wurde die Konzentration bis zum Versuchsende immer weiter angehoben

und erreichte final einen Wert von $1,80 \pm 0,06\%$. Die Tiere der Gruppe mit 64 Vol% Kapseln zeigten nach der Infusion den größten Bedarf an Isofluran, im Vergleich zu den anderen Gruppen. In dieser Gruppe stieg der Bedarf von $1,35 \pm 0,07\%$ unmittelbar vor der Infusion auf $1,82 \pm 0,07\%$ am Ende der Infusion. Die Konzentration musste bei den Tieren der 64 Vol% Gruppe 30 Minuten nach Infusionsende noch bis auf $1,93 \pm 0,04\%$ angehoben werden, bevor sie bis zum Versuchende wieder bis auf $1,87 \pm 0,04\%$ reduziert werden konnte.

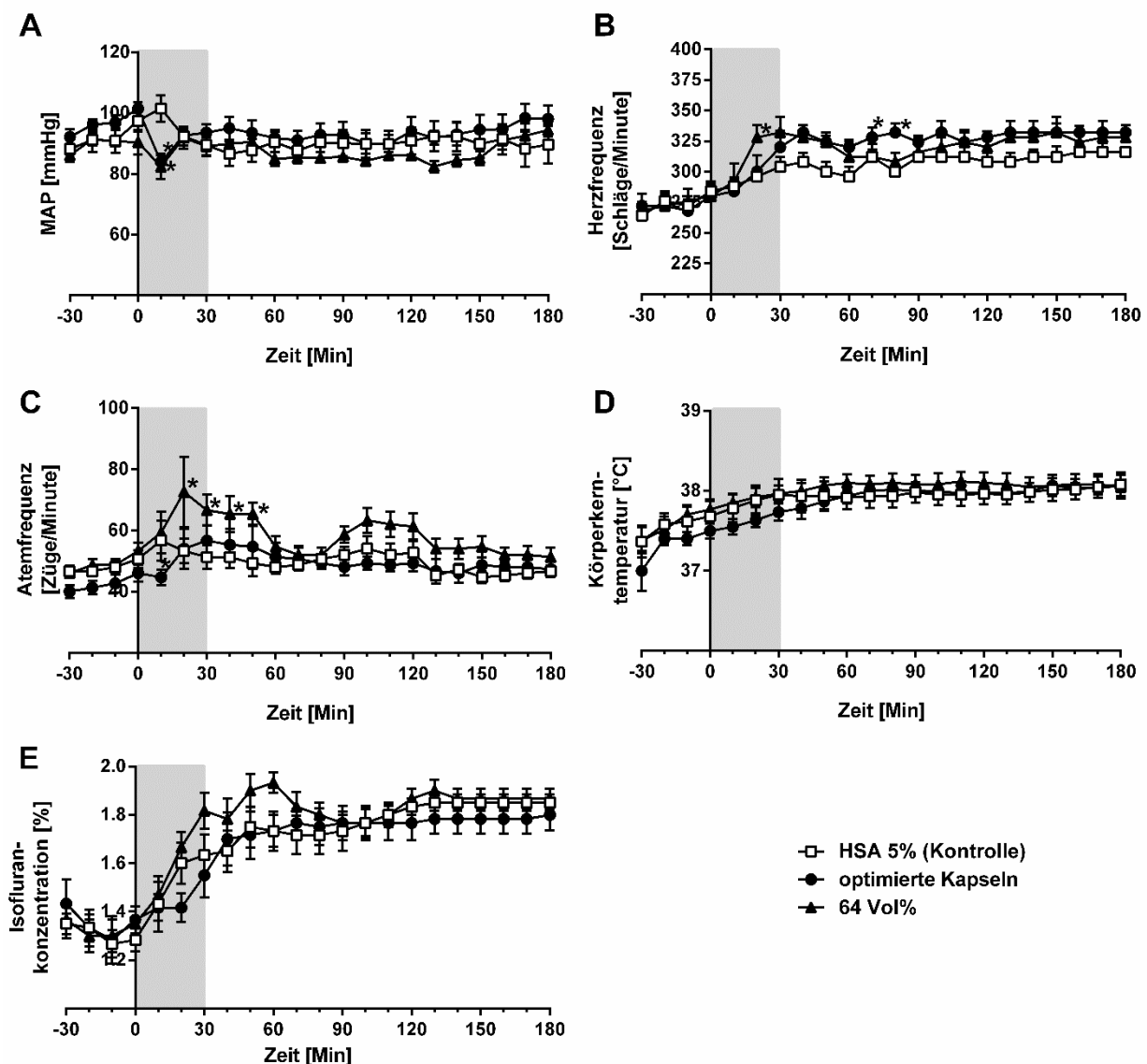


Abbildung 13: Einfluss der optimierten und 64 Vol% Kapseln auf den MAP (A), die Herzfrequenz (B), die Atemfrequenz (C), Die Körperkerntemperatur (D) und die Isoflurankonzentration (E). HSA 5% (Kontrolle), optimierte Kapseln und 64 Vol% Kapseln wurden über einen Zeitraum von 30 Minuten (grau hinterlegter Bereich) intravenös infundiert. Das Infusionsvolumen betrug 10 ml/KGW x 30 Minuten. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus $n=6$. * $p < 0,05$ verglichen mit der HSA 5%-Gruppe.

4.4.2 Einfluss auf Säure-Base-Haushalt und metabolische Parameter

Zur Beurteilung des Säure-Base-Haushalts (pH-Wert, Base Excess, Sauerstoffpartialdruck und Kohlenstoffdioxidpartialdruck) und der metabolischen Parameter (Glukose und Laktat) wurde den Tieren jede 30igste Minute (an acht Zeitpunkten) eine Blutprobe entnommen und folgend eine Blutgasanalyse durchgeführt. Die Daten der Blutgasanalyse sind in diesem Abschnitt dargestellt (Abbildung 14), sie zeigten zum Teil Veränderungen.

Initial lag der pH-Wert (Abbildung 14 A) in den arteriell entnommenen Blutproben bei allen Gruppen zwischen $\text{pH } 7,30 \pm 0,02$ und $\text{pH } 7,34 \pm 0,01$. Die Kapselgruppen blieben über den gesamten Versuchszeitraum innerhalb dieses pH-Wert Bereichs nahezu konstant, wohingegen sich der pH-Wert der Kontrollgruppe transient (Minute 30 nach Infusionsbeginn) in den azidotischen Bereich ($\text{pH } 7,27 \pm 0,02$) verschob. Bis Minute 90 nach Infusionsbeginn erhöhte sich der pH-Wert der Kontrolle wieder auf $7,32 \pm 0,02$ und blieb dann ebenfalls in diesem Bereich stabil.

Der durch die Blutgasanalyse bestimmte Base Excess (Abbildung 14 B) nahm in allen drei Gruppen während der Infusionsphase ab. Die Tiere der Gruppe mit Infusion von HSA 5% zeigten unmittelbar vor Infusionsbeginn einen Wert von $-0,67 \pm 0,4$ mmol/L und fielen am Infusionsende (Minute 30 nach Infusionsbeginn) auf $-2,40 \pm 0,7$ mmol/L ab. Die Tiere der Gruppe mit Infusion von optimierten Kapseln zeigten unmittelbar vor Infusionsstart einen Wert von $0,25 \pm 0,3$ mmol/L und fielen auf $-2,55 \pm 0,5$ mmol/L am Infusionsende (Minute 30 nach Infusionsbeginn) ab. Die Tiere der Gruppe mit Infusion von 64 Vol% Kapseln besaßen unmittelbar vor der Infusionsphase einen Wert von $-0,17 \pm 0,8$ mmol/L und zeigten am Ende der Infusion (Minute 30 nach Infusionsbeginn) $-1,90 \pm 0,4$ mmol/L. Direkt nach Infusionsende stieg der Base Excess der Kontrollgruppe langsam wieder bis auf $-0,93 \pm 0,3$ mmol/L (Messwerte am Versuchsende) an. Die beiden Kapselgruppen zeigten ab Minute 120 nach Infusionsbeginn einen Anstieg des Base Excess bis auf einen finalen Wert von $-0,72 \pm 0,3$ mmol/L für die 64 Vol% Gruppe und $-1,11 \pm 0,2$ mmol/L für die optimierte Kapselgruppe.

Der arteriell gemessene Sauerstoffpartialdruck (pO_2) (Abbildung 14 C) zeigte für beide Kapselgruppen zum Teil signifikante Erhöhungen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Kontrollgruppe zeigte einen weitgehend konstanten pO_2 von 448 ± 19 mmHg bis 470 ± 14 mmHg über den gesamten Versuchsverlauf. Die 64 Vol% Gruppe zeigte

unmittelbar nach Infusionsende (Minute 30 nach Infusionsbeginn) einen signifikanten Anstieg des pO_2 , im Vergleich zur Kontrollgruppe, von 462 ± 11 mmHg (vor Infusionsbeginn) auf 511 ± 12 mmHg. Der pO_2 der Tiere der Gruppe mit Infusion von 64 Vol% Kapseln fiel während des gesamten Versuchs nicht unter 490 ± 9 mmHg und blieb damit, im Vergleich zur Kontrolle, in weiten Teilen des Versuchs signifikant erhöht. Die Tiere der Gruppe mit optimierten Kapseln besaßen vor der Infusion einen pO_2 von 491 ± 12 mmHg der sich durch die Infusion in Minute 150 nach Infusionsbeginn auf 510 ± 8 mmHg und damit, im Vergleich zur Kontrolle, signifikant erhöhte. Der pO_2 dieser Gruppe fiel nach der Infusion nicht unter einen Wert von 482 ± 32 mmHg und blieb damit stets über den pO_2 -Werten der Kontrollgruppe.

Der Kohlenstoffdioxidpartialdruck (pCO_2) (Abbildung 14 D) der Kontrollgruppe lag stets oberhalb des Niveaus der Kapselgruppen. Von Versuchbeginn bis 60 Minuten nach Infusionsbeginn zeigte die Kontrollgruppe einen nahezu konstanten pCO_2 zwischen $52,8 \pm 3$ und $54,3 \pm 2$ mmHg. Anschließend fiel der Wert auf $48,7 \pm 2$ mmHg (Minute 90 nach Infusionsbeginn) leicht ab und stabilisierte sich in diesem Bereich. Der pCO_2 der optimierten Kapselgruppe fiel von $51,0 \pm 2$ mmHg unmittelbar vor der Infusion auf $44,4 \pm 2$ mmHg unmittelbar nach der Infusion und war damit, im Vergleich zur Kontrollgruppe, signifikant geringer. Auch die Gruppe mit 64 Vol% Kapseln zeigte unmittelbar nach der Infusion einen Abfall des pCO_2 von $52,8 \pm 1$ mmHg vor der Infusion auf $47,5 \pm 3$ mmHg. Beide Kapselgruppen stabilisierten sich nach Ende der intravenösen Infusion der Kapseln in diesem Bereich.

Der aus den Blutproben bestimmte Metabolit Laktat (Abbildung 14 E) stieg in der Kontrollgruppe von initial $1,15 \pm 0,2$ mmol/L auf $1,58 \pm 0,3$ mmol/L nach der Infusion (Minute 30 nach Infusionsbeginn) und blieb dann annähernd konstant. Die Laktatkonzentration der Gruppe mit optimierten Kapseln lag zu Versuchsbeginn bei $1,42 \pm 0,4$ mmol/L und erhöhte sich durch die Infusion auf $1,72 \pm 0,2$ mmol/L (30 Minuten nach Infusionsbeginn). Diese Erhöhung setzte sich weiter fort und war ab Minute 150 nach Infusionsbeginn signifikant gegenüber der Kontrollgruppe. Final lag die Laktatkonzentration in dieser Gruppe bei $2,20 \pm 0,1$ mmol/L. Die Tiere der 64 Vol% Kapselgruppe hatten zu Beginn des Versuchs einen Blutlaktatwert von $0,72 \pm 0,1$ mmol/L. Durch die Infusion der 64 Vol% Kapseln stieg das Laktat moderat auf $1,00 \pm 0,1$ mmol/L (Minute 30 nach Infusionsbeginn) an, war aber im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant geringer. Auch die Laktatkonzentration 60 Minuten nach

Infusionsbeginn war im Vergleich zur Kontrollgruppe mit $0,90 \pm 0,1$ mmol/L signifikant niedriger. Ab Minute 60 nach Infusionsbeginn stieg die Laktatkonzentration langsam aber stetig weiter an, blieb aber final mit $1,27 \pm 0,2$ mmol/L unterhalb des Wertes der Kontrollgruppe.

Die arterielle Blutglukosekonzentration (Abbildung 14 F) blieb in der Kontrollgruppe über den gesamten Versuchsverlauf nahezu konstant zwischen 170 ± 12 und 190 ± 7 mg/dL. Die Gruppe der optimierten Kapseln zeigte durch die Infusion zunächst einen Anstieg von 158 ± 7 mg/dL am Versuchsbeginn auf 196 ± 21 mg/dL in Minute 60 nach Infusionsbeginn. Darauf folgend fiel die Blutglukosekonzentration stetig weiter ab bis auf 149 ± 6 mg/dL am Versuchsende. Auch die Tiere der Versuchsgruppe 64 Vol% zeigten durch die Infusion zunächst einen leichten Anstieg der Blutglukosekonzentration von 158 ± 10 mg/dL am Versuchsbeginn auf 174 ± 7 mg/dL in Minute 30 nach Infusionsbeginn. Auch diese Gruppe zeigte folgend auf den Anstieg über den weiteren Verlauf des Versuchs einen Abfall der Glukosekonzentration. Dieser Abfall war ab Minute 120 nach Infusionsbeginn signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe und belief sich final auf einen Wert von 137 ± 2 mg/dL.

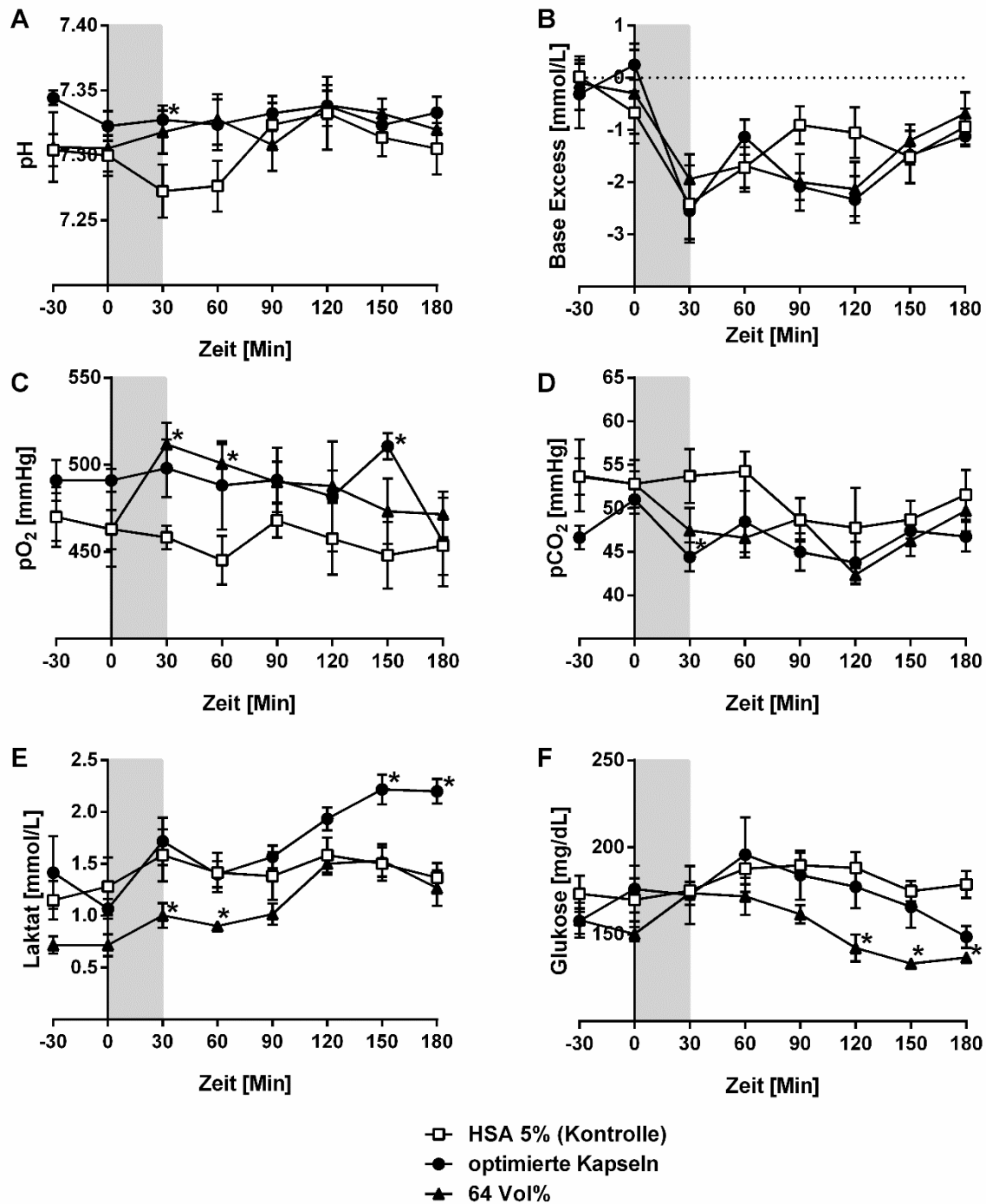


Abbildung 14: Einfluss der optimierten und 64 Vol% Kapseln auf die mit Blutgasanalyse bestimmten Parameter pH-Wert (A), Base Excess (B), pO₂ (C), pCO₂ (D), Laktat (E) und Glukose (F). HSA 5% (Kontrolle), optimierte Kapseln und 64 Vol% Kapseln wurden über einen Zeitraum von 30 Minuten (grau hinterlegter Bereich) intravenös infundiert. Das Infusionsvolumen betrug 10 ml/KGW x 30 Minuten. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus n=6. * p < 0,05 verglichen mit der HSA 5%-Gruppe.

4.4.3 Einfluss auf Organschädigungsparameter

Die Auswertung der Plasmaenzymaktivitäten (Abbildung 15) im Blutplasma, als Anhaltspunkt für Organschädigung, zeigte zum Teil signifikante Unterschiede im Vergleich zur HSA 5% Kontrollgruppe.

Die intravenöse Infusion von HSA 5% (Kontrolle) ergab keine Aktivitätsveränderung der gemessenen Enzyme Alaninaminotransferase (ALAT), Aspartataminotransferase (ASAT), und Kreatinkinase (CK). Die gemessene Aktivität der Laktatdehydrogenase (LDH) zeigte nach der Infusion von HSA 5% einen leichten Anstieg von $86,2 \pm 21$ U/L in Minute 120 auf $221,6 \pm 75$ U/L am Versuchsende (180 Minuten nach Infusionsbeginn).

Als Folge der Infusion von optimierten Kapseln kam es ab Minute 90 zu einem kontinuierlichen Anstieg der Aminotransferase ALAT. Am Versuchsende (180 Minuten nach Infusionsbeginn) war diese Erhöhung von $51,8 \pm 3$ U/L am Versuchsbeginn auf $83,1 \pm 20$ U/L, im Vergleich zur Kontrollgruppe, signifikant (Abbildung 15 A). Die Aminotransferase ASAT (Abbildung 15 B) zeigte 150 Minuten nach Infusionsbeginn eine signifikante Aktivitätserhöhung von $60,3 \pm 3$ U/L am Versuchsbeginn auf $185,1 \pm 28$ U/L. Diese Aktivität stieg bis zum Versuchsende auf $267,5 \pm 65$ U/L an und blieb damit weiterhin signifikant erhöht. Eine signifikante Erhöhung der plasmatischen Aktivität der CK (Abbildung 15 C) von $262,4 \pm 54$ U/L am Versuchsbeginn auf $585,9 \pm 103$ U/L erfolgte 120 Minuten nach Infusionsbeginn der optimierten Kapseln. Die CK-Aktivität stieg weiter an und stabilisierte sich bis zum Versuchsende um etwa 640 U/L und war damit am Versuchsende nicht mehr signifikant, sondern tendenziell erhöht, im Vergleich zur Kontrollgruppe. Ähnlich zu den Verläufen der CK stieg die plasmatische Enzymaktivität von LDH (Abbildung 15 D). Neunzig Minuten nach Infusionsende der optimierten Kapseln zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Aktivität von $63,6 \pm 18$ U/L am Beginn des Versuchs auf $251,7 \pm 24$ U/L. Die Aktivität des Enzyms LDH erhöhte sich allerdings bis zum Versuchsende kontinuierlich weiter, so dass am Versuchsende eine Aktivität von $718,4 \pm 78$ U/L vorlag.

Die Infusion der 64 Vol% Kapseln zeigte im Wesentlichen einen ähnlichen Verlauf der Aktivitätserhöhungen wie die der optimierten Kapselgruppe, allerdings war das Niveau der erreichten Aktivitäten final ausgeprägter und signifikante Unterschiede, im Vergleich zu der Kontrollgruppe, konnten bereits zu früheren Zeitpunkten beobachtet werden. So zeigten die Tiere 150 Minuten nach Infusionsbeginn einen signifikanten

Anstieg der Aktivität des Enzyms ALAT (Abbildung 15 A) von $57,2 \pm 6$ U/L am Versuchsbeginn auf $94,6 \pm 40$ U/L und damit 30 Minuten früher als bei der Infusion von optimierten Kapseln. Auch der signifikante Anstieg der gemessenen Enzymaktivität von ASAT (Abbildung 15 B) konnte, im Vergleich zur Infusion von optimierten Kapseln, 30 Minuten früher beobachtet werden. Hier wurde die Erhöhung von initialen $65,6 \pm 4$ U/L auf $158,3 \pm 54$ U/L in Minute 90 nach Infusionsbeginn festgestellt. Ähnlich wie nach Infusion von optimierten Kapseln stiegen die Aktivitäten der Transaminasen ALAT und ASAT bis zum Versuchsende weiter kontinuierlich an, so dass am Ende für ALAT ein Wert von $139,9 \pm 49$ U/L und für ASAT ein Wert von $391,5 \pm 107$ U/L gemessen wurde, die damit beide oberhalb der Werte der optimierten Kapselgruppe lagen. Die Aktivitätsbestimmung der CK zeigte im Vergleich zu der Messung nach Infusion mit optimierten Kapseln ab Minute 150 nach Infusionsbeginn einen etwas anderen Verlauf. Nachdem es, als Folge der Infusion von 64 Vol% Kapseln, in Minute 90 nach Infusionsbeginn zu einem signifikanten Anstieg von initial $96,7 \pm 56$ U/L auf 732 ± 257 U/L kam, fiel der Wert bis zum Versuchsende wieder auf $703,1 \pm 239$ U/L ab und befand sich damit auf einem ähnlichen Niveau wie das der Gruppe der optimierten Kapseln. Die Aktivität der CK war damit am Versuchsende in der Gruppe mit Infusion von 64 Vol% Kapseln, im Vergleich zur Kontrollgruppe, nicht mehr signifikant, sondern tendenziell erhöht. Die enzymatische Aktivität der LDH (Abbildung 15 D) führte 90 Minuten nach Infusionsbeginn zu einer signifikanten Erhöhung im Plasma verglichen zur Kontrolle und damit erneut 30 Minuten früher als nach Infusion von optimierten Kapseln. Der Wert stieg von initial $82,6 \pm 15$ U/L auf $432,3 \pm 134$ U/L (90 Minuten nach Infusionsbeginn) an und erreichte final $1084,9 \pm 412$ U/L und lag damit ab Minute 90 dauerhaft oberhalb des Wertes der Tiere nach Infusion von optimierten Kapseln.

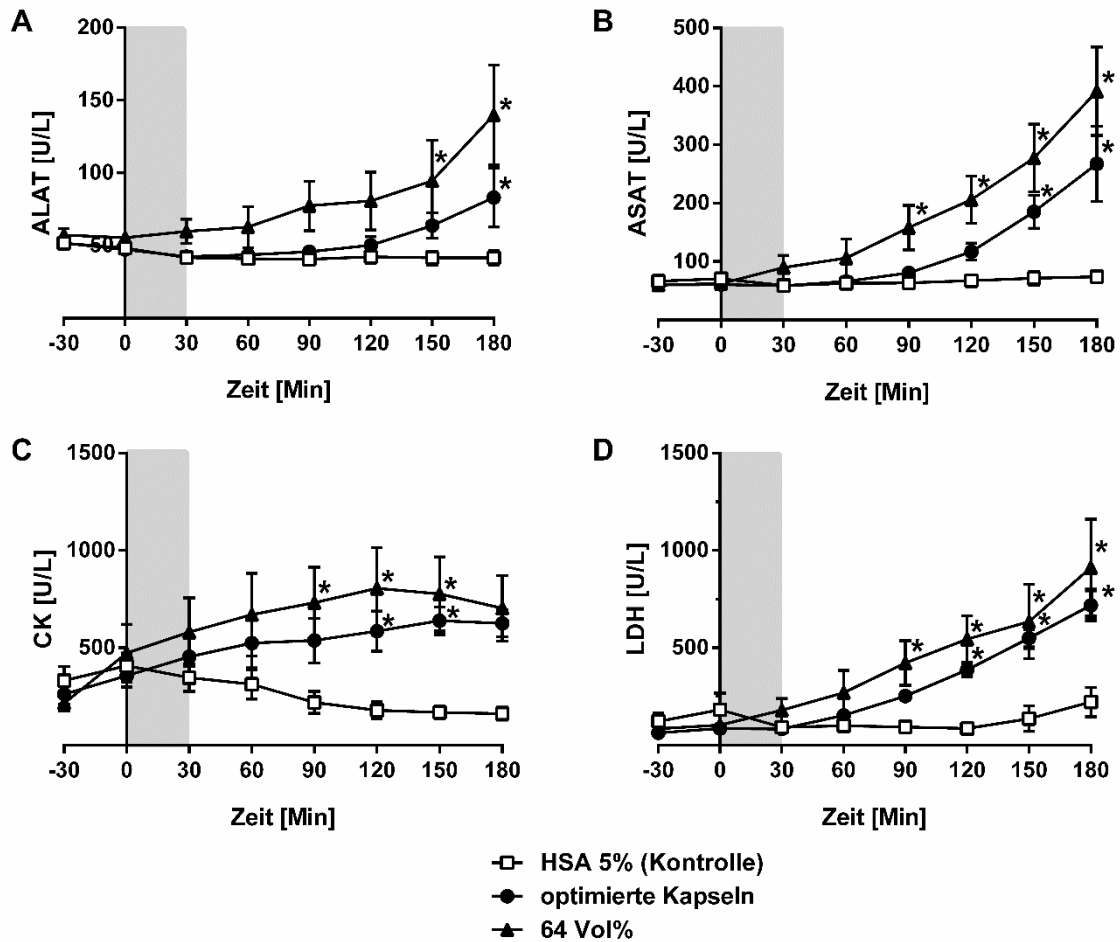


Abbildung 15: Einfluss der optimierten und 64 Vol% Kapseln auf die Organschädigungsparameter ALAT (A), ASAT (B), CK (C) und LDH (D). HSA 5% (Kontrolle), optimierte Kapseln und 64 Vol% Kapseln wurden über einen Zeitraum von 30 Minuten (grau hinterlegter Bereich) intravenös infundiert. Das Infusionsvolumen betrug 10 ml/KGW x 30 Minuten. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus $n=6$. * $p < 0,05$ verglichen mit der HSA 5%-Gruppe.

4.4.4 Einfluss auf Elektrolyte, Hämoglobin und Hämatokrit

Die im Blut gemessenen Konzentrationen der Elektrolyte Kalium (4,4-5,1 mmol/L), Natrium (138-140 mmol/L), Calcium (1,3-1,4 mmol/L) und Chlorid (107-113 mmol/L) zeigten während des gesamten Versuchsverlaufs keine wesentlichen Veränderungen im Vergleich der drei Versuchsgruppen (Daten nicht gezeigt). Der Hämoglobingehalt und der Hämatokrit des Vollblutes sanken, unabhängig von der jeweils eingesetzten Infusionslösung, infolge der Verdünnung durch die Infusion in allen Gruppen leicht ab. Initial zeigten alle Gruppen einen Hämatokrit um die 40% der final bis auf etwa 32% abfiel (Daten nicht gezeigt).

4.4.5 Einfluss auf Organstrukturen

Die in Abschnitt 3.2.9 beschriebene histologische Untersuchung von Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbten Organen zeigte Veränderungen in der Organstruktur der Milz (Abbildung 16). Die pathologische Beurteilung der Leber (Abbildung 18) Darm, Niere, Herz, Lunge und *M. Gastrocnemius* blieb ohne Befund (Bilder nicht gezeigt).

Im Anschluss an die HE-Färbung zeigte die lichtmikroskopische Analyse (Beurteilung der Zellschädigung in roter und weißer Pulpa) der Milzpräparate von Tieren der Kontrollgruppe keinen pathologischen Befund (Abbildung 16 A, B). Sowohl die rote als auch die weiße Pulpa zeigten eine gleichmäßige Gewebestruktur ohne auffällige Veränderungen. Im Vergleich dazu fiel bei der Untersuchung beider Kapselgruppen eine deutliche Gewebeveränderung auf. Sowohl in der Gruppe mit Infusion von optimierten Kapseln (Abbildung 16 C, D) als auch in der Gruppe mit Infusion von 64 Vol% Kapseln (Abbildung 16 E, F) zeigte sich eine weiße Pulpa ohne pathologischen Befund sowie eine intakte Marginalzone. Die rote Pulpa hingegen zeigte erhebliche Hohlräume und eine insgesamt aufgelockerte Struktur in diesem Bereich. Eine immunhistologische Untersuchung des Organs zeigte großlumig gefüllte Makrophagen in der roten Pulpa der Milzen nach Infusion von optimierten und 64 Vol% Kapseln (Abbildung 17). Bei genauerer Betrachtung war eine Änderung der Zellstruktur der Makrophagen zu beobachten, welche ihre klare Zellabgrenzung (in der Kontrollgruppe, Abbildung 17 A, B) gegen ein schaumzellartiges Aussehen (in den Kapselgruppen: optimierte Kapseln, Abbildung 17 C, D und 64 Vol% Abbildung 17 E, F) umstrukturiert hatten. Der Inhalt der Makrophagen ließ sich in beiden Kapselgruppen, im Vergleich zur Kontrolle, nicht anfärben.

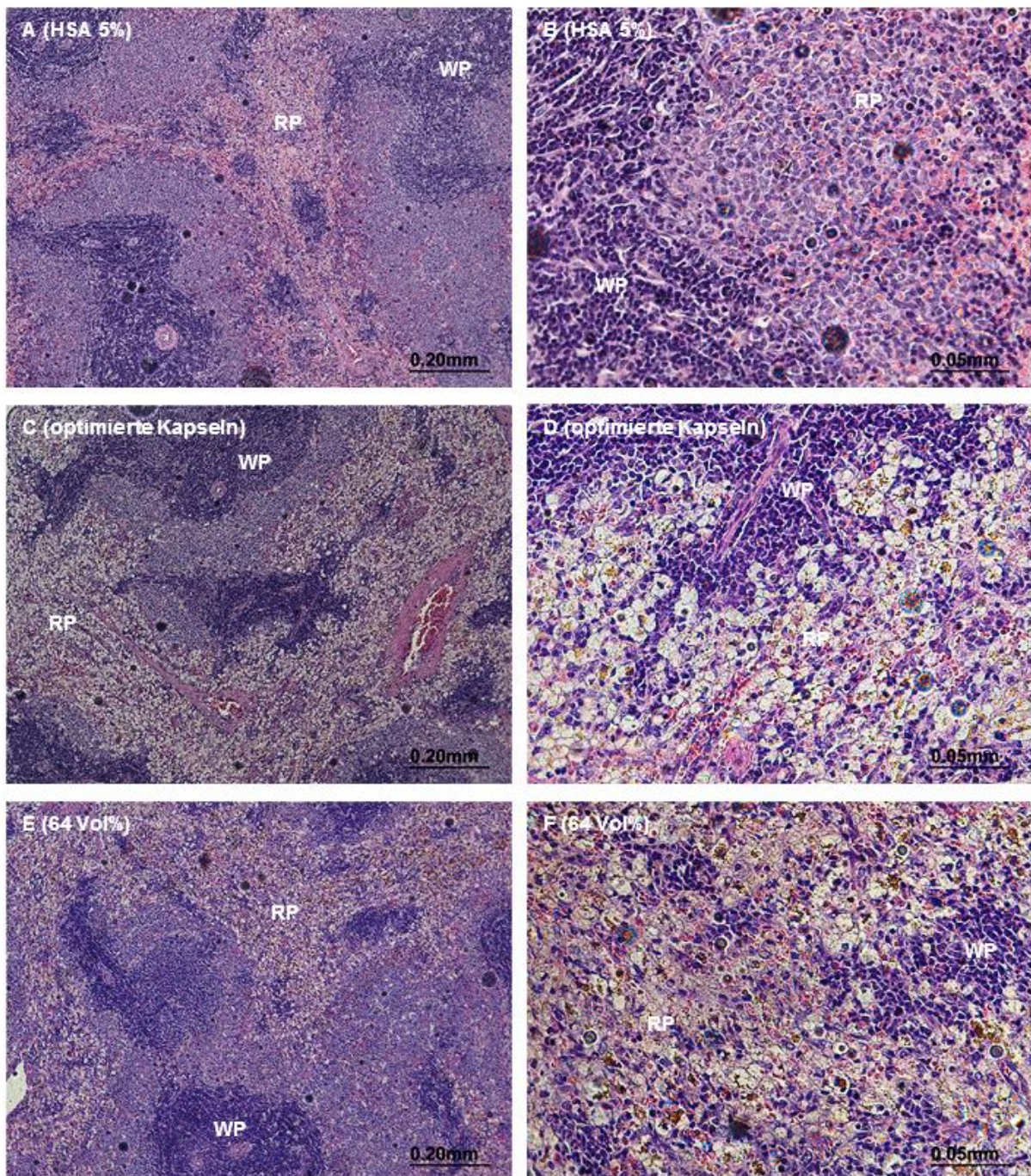


Abbildung 16: Einfluss der optimierten und 64 Vol% Kapseln auf die Organstruktur der Milz. HSA 5% (Kontrolle), optimierte Kapseln und 64 Vol% Kapseln wurden über einen Zeitraum von 30 Minuten intravenös infundiert. Die histologische Auswertung der Milzen zeigte in der HE-Färbung, im Vergleich zur Kontrolle (A, B) morphologische Veränderungen der roten Pulpa nach intra venöser Infusion von optimierten (C, D) sowie 64 Vol% (E, F) Kapseln. Bild A, C und E in 100facher Vergrößerung. Bild B, D und F in 400facher Vergrößerung. Gezeigt sind repräsentative Beispiele aus n=6 je Versuchsgruppe. WP= weiße Pulpa, RP= rote Pulpa.

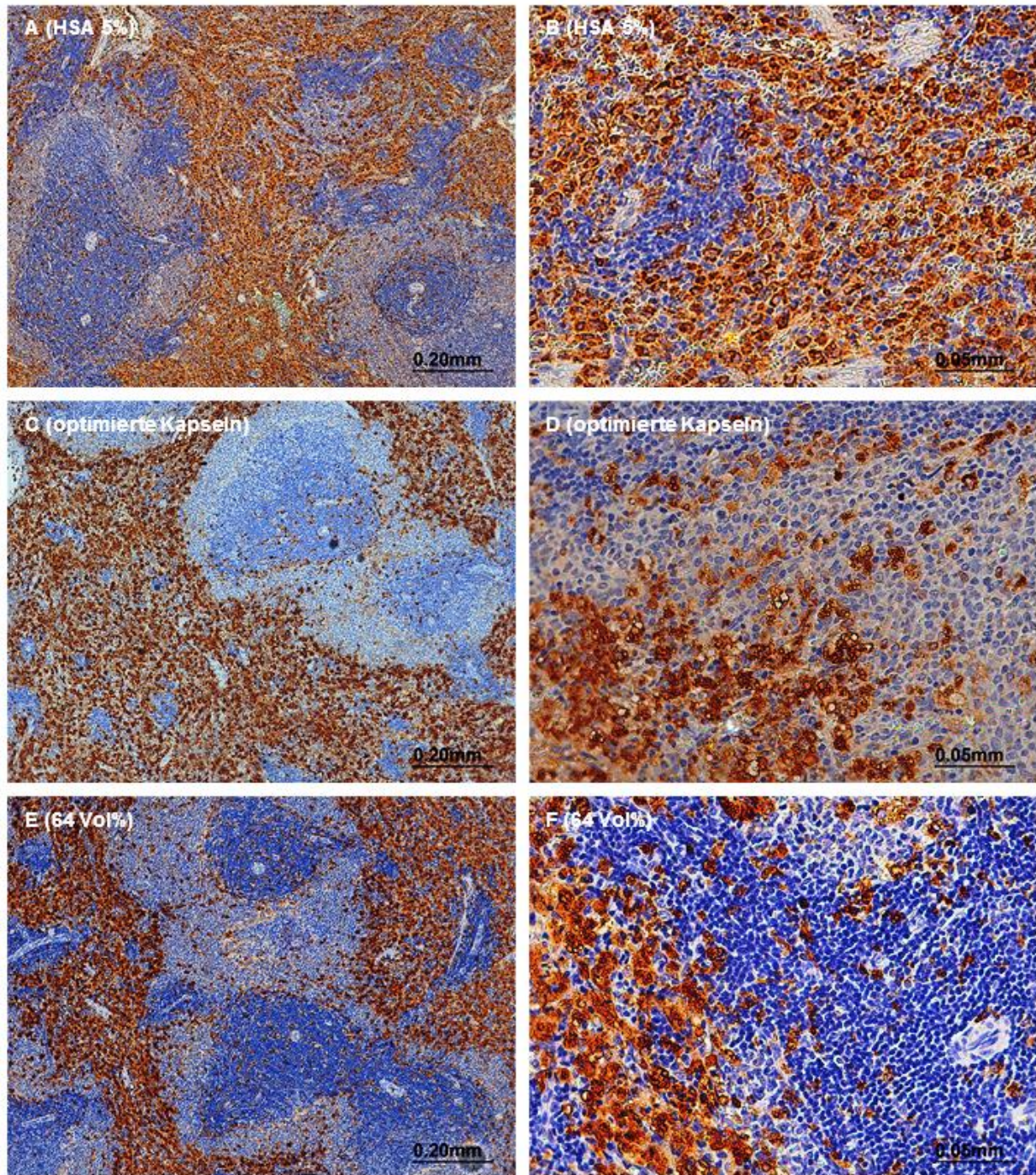


Abbildung 17: Einfluss der optimierten und 64 Vol% Kapseln auf die Makrophagen der Milz. Die immunhistologische Untersuchung der Milz zeigte deutliche Veränderungen der Makrophagenstruktur (braune Färbung) im Vergleich zur Kontrolle (A, B) nach Infusion von optimierten Kapseln (C, D) oder 64 Vol% Kapseln (E, F). HSA 5% (Kontrolle), optimierte Kapseln und 64 Vol% Kapseln wurden über einen Zeitraum von 30 Minuten intravenös infundiert. Bild A, C und E in 100facher Vergrößerung. Bild B, D und F in 400facher Vergrößerung. Gezeigt sind repräsentative Beispiele aus n=6 je Versuchsgruppe.

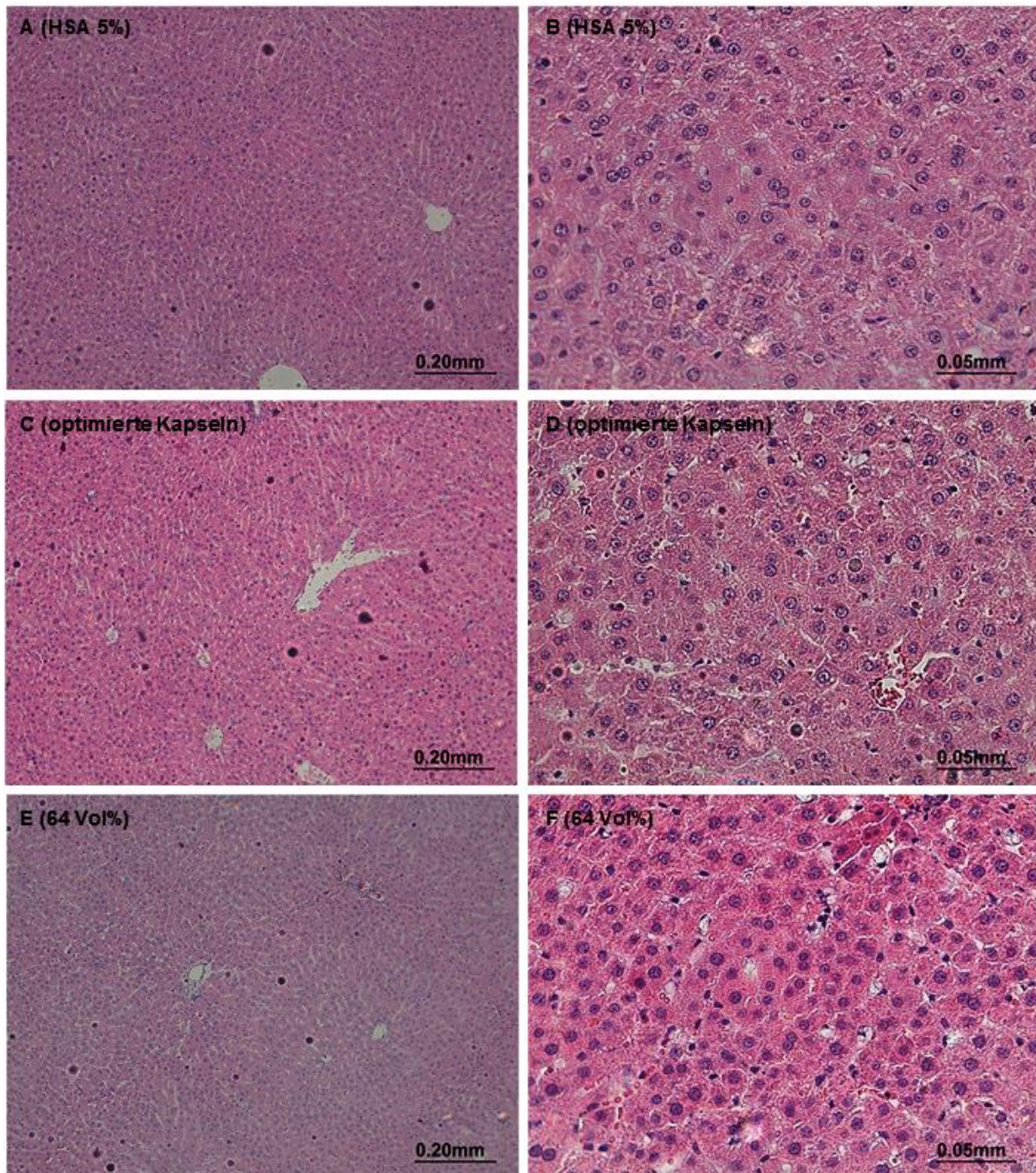


Abbildung 18: Einfluss der optimierten und 64 Vol% Kapseln auf die Organstruktur der Leber. HSA 5% (Kontrolle) (A, B), optimierte Kapseln (C, D) und 64 Vol% Kapseln (E, F) wurden über einen Zeitraum von 30 Minuten intravenös infundiert. Die histologische Auswertung der Lebern zeigte keine strukturellen Veränderungen in der HE-Färbung. Gezeigt sind repräsentative Beispiele aus n=6 je Versuchsgruppe. Bild A, C und E in 100facher Vergrößerung. Bild B, D und F in 400facher Vergrößerung. Gezeigt sind repräsentative Beispiele aus n=6 je Versuchsgruppe.

4.5 Halbwertszeit

Die zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infusion, im Vollblut gemessene prozentuale Abnahme der Kapselkonzentration zeigte für optimierte Kapseln eine Halbwertszeit von 170 Minuten. Am Versuchsende (180 Minuten nach Infusionsende) waren 52,9% der optimierten Kapseln aus dem Gefäßsystem eliminiert.

4.7 Herzperfusion nach Langendorff

4.7.1 Messung der Sauerstofftransportkapazität

Zur Untersuchung der Sauerstofftransportkapazität der Perfusionslösungen wurde diese, wie in Abschnitt 3.2.7 beschrieben, für den modifizierten KH-Puffer und 4 Vol% Kapseln (in modifiziertem KH-Puffer) bestimmt (Abbildung 19). Dabei wurde für den KH-Puffer eine Sauerstoffaufnahme von $3,05 \pm 0,6$ ml O₂/dL und für die 4 Vol% Kapseln eine signifikant höhere Sauerstoffaufnahme von $4,79 \pm 1,4$ ml O₂/dL gemessen. Damit zeigten die 4 Vol% Kapseln einen 1,6-mal höheren Sauerstoffgehalt im Vergleich zum KH-Puffer.

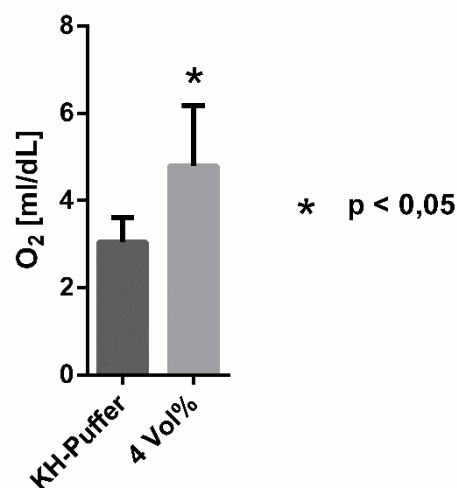


Abbildung 19: Sauerstofftransportkapazität. Messung des freigesetzten Sauerstoffs (mittels Respirometer) von KH-Puffer (dunkelgrau) und 4 Vol% Kapseln in KH-Puffer (hellgrau). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD aus n=25. Mit $p < 0,05$ konnten signifikanten Unterschiede ermittelt werden.

4.7.2 Dosis Determination

In diesem Versuch wurde die optimale Kapselkonzentration, zur Aufrechterhaltung einer physiologischen Herzfunktion trotz reduzierten Perfusionsflusses, ermittelt (Abbildung 20). Es wurde ein Herz mit KH-Puffer und parallel dazu ein Herz mit Kapselsuspension behandelt. Der während der Phase der Stabilisierung (am Versuchsbeginn: mit 100% Flussgeschwindigkeit und KH-Puffer als Perfusionsmedium) erreichte Links-Ventrikulär-Entwickelte-Druck (LVDP) beider Herzen (Kontroll- und Kapselherz) wurde gleich 100% gesetzt (Abbildung 20, grauer Hintergrund). Im folgenden Schritt (Perfusion beider Herzen immer noch mit KH-Puffer) wurde die Flussgeschwindigkeit auf 50% reduziert und bis zum Versuchsende so belassen (Abbildung 20, weißer Hintergrund). Die Flussreduzierung führte zu einem Abfall des LVDP im Kontrollherz auf 62,3% und zu einem Abfall des LVDP auf 58,6% in dem Kapselherz. Während der ersten Behandlung wurde das Kapselherz mit 2 Vol% Kapseln perfundiert, unterdessen wurde das Kontrollherz weiter mit KH-Puffer perfundiert. Die Kapselbehandlung führte zu einem Anstieg des LVDP auf 73,5% im Vergleich zum Kontrollherz, welches 71,0% erreichte. Während des Auswaschens fiel der LVDP in dem Kontrollherz auf 49,0% während das Kapselherz einen LVDP von 65,0% beibehielt. Darauffolgend wurde das Kapselherz mit 4 Vol% Kapseln und das Kontrollherz fortwährend mit KH-Puffer perfundiert. Die 4 Vol% Kapselsuspension konnte den LVDP in dem Kapselherz auf 110,4% erhöhen, während das Kontrollherz einen LVDP von 49,9% zeigte. Trotz des reduzierten Flusses (auf 50%) konnte durch die 4 Vol% Kapseln ein LVDP erreicht werden, der höher als der initial gemessene LVDP mit maximalem Fluss von 100% lag. Nach dem nächsten Schritt des Auswaschens (Perfusion beider Herzen mit KH-Puffer) zeigte das Kapselherz einen LVDP von 85,9% während das Kontrollherz einen LVDP von 74,1% erreichte. Während der Behandlung mit 6 Vol% Kapseln stieg der LVDP des Herzens auf 123,3% an. Das Kontrollherz zeigte während dieser Versuchsperiode einen Abfall des LVDP auf 51,4%. Der finale Schritt des Auswaschens erzeugte im Kapselherz einen LVDP von 50,1% und im Kontrollherz einen LVDP von 61,9%.

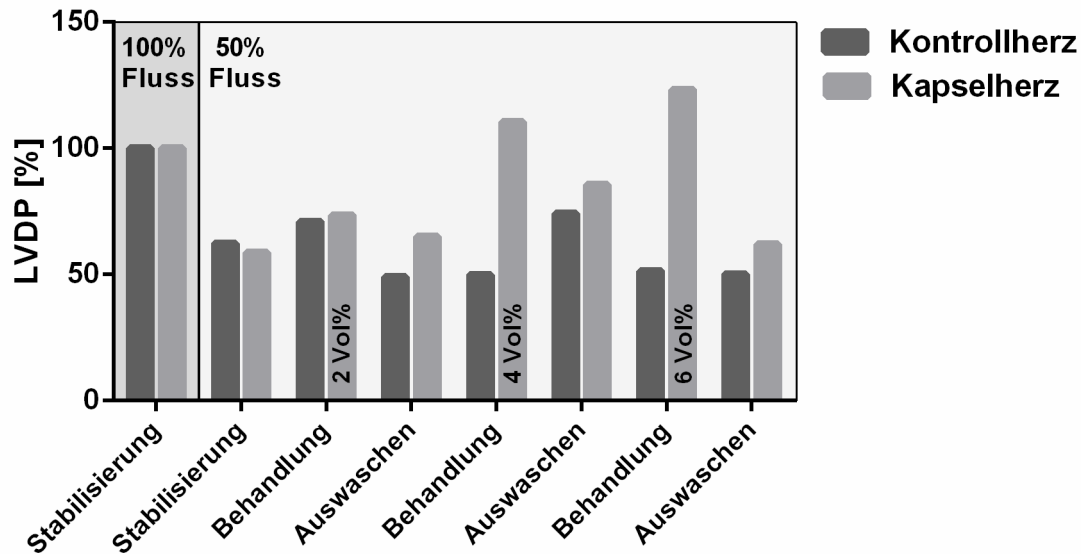


Abbildung 20: Dosis Determination. Nach der initialen Stabilisierungsphase (Fluss 100%) wurde der Fluss reduziert (Fluss 50%). Zur Bestimmung der idealen Dosis wurde das Kontrollherz (dunkelgrau) kontinuierlich mit KH-Puffer perfundiert. Das Kapselherz (hellgrau) wurde mit 2 Vol% Kapseln in KH-Puffer (erste Behandlung), 4 Vol% Kapseln in KH-Puffer (zweite Behandlung) und 6 Vol% Kapseln in KH-Puffer (dritte Behandlung) perfundiert. Das Auswaschen erfolgte jeweils mit KH-Puffer. Der initiale LVDP wurde auf 100% festgelegt. $n=1$.

4.7.3 Repetition

Nach der initialen Dosisdetermination wurde in diesem Versuch getestet, ob die Herzen wiederholt auf die als effektiv ermittelte Dosis von 4 Vol% ansprechen (Abbildung 21). Der initiale Fluss von 100%, während der Stabilisierungsphase am Versuchsbeginn (mit KH-Puffer als Perfusat in beiden Herzen), führte zu einem LVDP von 91,9 mmHg und einem „Rate-Pressure-Product“ (RPP) von 13,0 mmHg*bpm*1000 in den Kontrollherzen und einem LVDP von 86,3 mmHg sowie einem RPP von 14,0 mmHg*bpm*1000 in den Kapselherzen (Abbildung 21, grauer Hintergrund). Die Flussreduktion auf 50% führte in den Kontrollherzen zu einem Abfall des LVDP auf 57 mmHg und einem Abfall des RPP auf 6,1 mmHg*bpm*1000, ähnliche Werte waren bei den Kapselherzen zu beobachten (LVDP: 57,0 mmHg und RPP: 5,6 mmHg*bpm*1000). Die erste Behandlung resultierte bei den Kontrollherzen, die weiter mit KH-Puffer perfundiert wurden, in einem annähernd unveränderten LVDP von 57,3 mmHg und einem RPP von 6,4 mmHg*bpm*1000. Die Kapselherzen hingegen erreichten durch die Behandlung mit 4 Vol% Kapseln einen Anstieg des LVDP auf 68,0 mmHg und einen Anstieg des RPP auf 8,5 mmHg*bpm*1000. Die folgende Periode des Auswaschens, mit KH-Puffer in beiden Herzgruppen, führte in

den Kontrollherzen zu einem LVDP von 63,2 mmHg und einem RPP von 6,9 mmHg*bpm*1000. Indessen erreichten die Kapselherzen in dieser Phase des Versuchs einen LVDP von 60,3 mmHg und einen RPP von 6,3 mmHg*bpm*1000. Der zweite Behandlungsschritt erzeugte in den Kontrollherzen, die fortwährend mit KH-Puffer perfundiert wurden, einen LVDP von 63,8 mmHg und einen RPP von 7,0 mmHg*bpm*1000. Die Kapseln erreichten nach der zweiten Behandlung einen erneuten Anstieg des LVDP auf 70,0 mmHg sowie einen Anstieg des RPP auf 10,3 mmHg*bpm*1000.

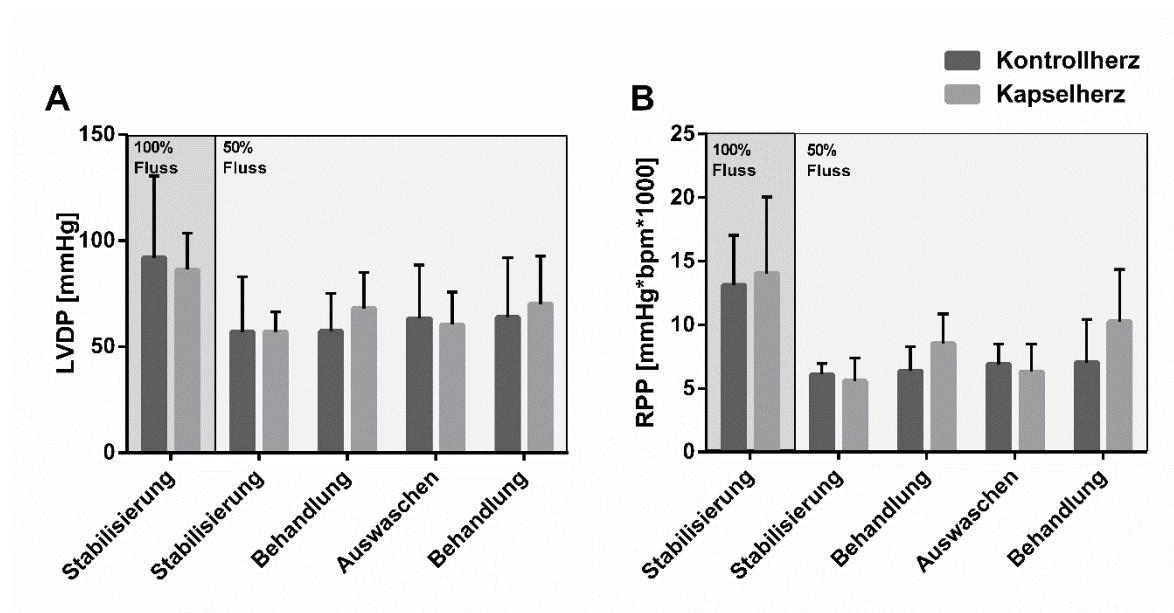


Abbildung 21: Einfluss einer wiederholten Behandlung auf den LVDP (A) und RPP (B). Nach der initialen Stabilisierungsphase (Fluss 100%) mit KH-Puffer wurde der Fluss reduziert (Fluss 50%). Die Kontrollherzen (dunkelgrau) wurden kontinuierlich mit KH-Puffer perfundiert. Im Vergleich dazu wurden die Kapselherzen (hellgrau) mit 4 Vol% Kapseln in KH-Puffer perfundiert (Behandlung). Das Auswaschen erfolgte jeweils mit KH-Puffer. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD des LVDP (A) und RPP (B) aus $n=6$. Mit $p<0,05$ konnten keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden.

4.7.4 Massive Flussreduktion

Nach der erfolgreichen Repetition wurde nun im nächsten Schritt eine massive Flussreduktion durchgeführt (Abbildung 22). In der initialen Phase des Versuchs, mit 100% Flussgeschwindigkeit, entwickelten die mit KH-Puffer perfundierten Kontrollherzen einen LVDP von 106,4 mmHg und ein RPP von 23,1 mmHg*bpm*1000. Die Kapselherzen erreichten in dieser Versuchsperiode ähnliche Werte mit einem LVDP von 109,2 mmHg und einem RPP von 22,0 mmHg*bpm*1000. Die erste

Flussreduktion auf 80% Fluss führte in den Kontrollherzen zu einem Abfall des LVDP auf 79,5 mmHg und des RPP auf 16,0 mmHg*bpm*1000. Die LVDP Verringerung der Kapselherzen fiel hingegen moderat aus (auf 100,5 mmHg), so dass der Wert im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant hoch blieb. Auch das RPP blieb im Vergleich zu den Kontrollherzen mit 18,0 mmHg*bpm*1000 erhöht. Die zweite Flussreduktion (auf 60% Fluss) führte in den Kontrollherzen zu einem weiteren Abfall des LVDP auf 72,8 mmHg sowie einem Abfall des RPP auf 12,2 mmHg*bpm*1000. Im Vergleich dazu blieben der LVDP und das RPP der Kapselherzen mit 92,3 mmHg und 14,4 mmHg*bpm*1000 auf einem wiederholt höheren Niveau. Gleiches gilt für den nächsten Reduktionsschritt. Auch bei einem Fluss von 40% lagen die Werte der Kapselherzen in einem höheren Bereich als die der Kontrollherzen (Kontrollherzen: LVDP 48,2 mmHg und RPP 7,7 mmHg*bpm*1000; Kapselherzen: LVDP 70,6 mmHg und RPP 11,2 mmHg*bpm*1000), wobei das Kapselherz-RPP signifikant höher lag als das RPP der Kontrollherzen. Die finale Flussreduktion auf 20% zeigte wiederum ein ähnliches Bild. Hierbei fiel der LVDP der Kontrollherzen weiter auf 32,8 mmHg und das RPP auf 3,0 mmHg*bpm*1000. Im Vergleich dazu zeigten die Kontrollherzen einen signifikant höheren LVDP von 48,1 mmHg sowie ein RPP von 4,0 mmHg*bpm*1000. In der finalen Phase des Versuchs wurde der initiale Fluss wiederhergestellt (100%). Diese Flusserhöhung resultierte in einem Anstieg des LVDP sowohl in den Kontrollherzen (104,4 mmHg) als auch in den Kapselherzen (133,8 mmHg), wobei der LVDP der Kapselherzen signifikant höher lag. Im Vergleich zu den initialen Werten des LVDP überstiegen die Kapselherzen diesen Wert um 24,6 mmHg, wohingegen die Kontrollherzen den initialen LVDP nicht mehr erreichen konnten. Im Hinblick auf das finale RPP konnten beide Gruppen den initialen Wert erneut erreichen (Kontrollherz: 23,6 mmHg*bpm*1000 und Kapselherz: 23,3 mmHg*bpm*1000).

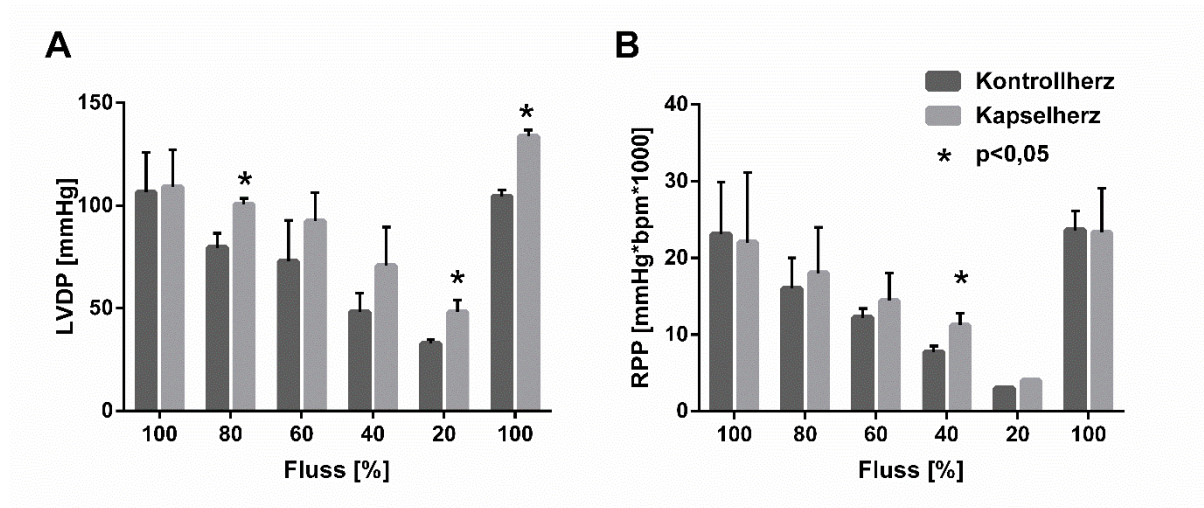


Abbildung 22: Auswirkung einer massiven Flussreduktion auf LVDP (A) und RPP (B). Nach der initialen Stabilisierungsphase (Fluss 100%) wurde der Fluss schrittweise auf 80%, 60%, 40% und 20% reduziert. Final wurde der initiale Fluss von 100% wiederhergestellt. Die Kontrollherzen (dunkelgrau) wurden kontinuierlich mit KH-Puffer perfundiert. Im Vergleich dazu wurden die Kapselherzen (hellgrau) immerzu mit 4 Vol% Kapseln in KH-Puffer perfundiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD des LVDP (A) und RPP (B) aus $n=6$. * $p < 0,05$ verglichen mit den Kontrollherzen.

4.8 Hämodilution

In diesem Versuch wurden Ratten einer normovolämen Hämodilution unterzogen, bis sie einen finalen Hämatokrit von 5% erreichten. Die Dilution wurde dabei entweder mit HSA 5% (Kontrolle) oder 12 Vol% Kapseln durchgeführt. Während des gesamten Versuchsverlaufs wurden systemische Parameter erhoben und aus den entnommenen Blutproben metabolische Parameter sowie Organschädigungsparameter bestimmt. Einige Parameter zeigten dabei signifikante Veränderungen.

4.8.1 Einfluss auf das Überleben der Tiere

Nach Erreichen eines Hämatokrits von 5% wurden die Tiere bis zu ihrem Versterben beobachtet, daher hat keines der Tiere den Versuch überlebt (Abbildung 23). Das erste Tier der Kontrollgruppe verstarb bereits am Ende der Dilutionsphase in Minute 198. Die ersten beiden Kapseltiere hingegen verstarben in Minute 230 und lebten damit 32 Minuten länger. Zeitgleich mit den beiden Kapseltieren verstarben drei weitere Kontrolltiere in Minute 230. Jeweils ein Tier aus beiden Gruppen verstarb in Minute 250, gefolgt von jeweils zwei Tieren aus jeder Gruppe in Minute 260. Das letzte Kontrolltier verstarb letztlich in Minute 280 des Versuchs. Zwei weitere Tiere der Kapselgruppe verstarben in Minute 270 und 280 bevor das letzte Tier in Minute 290

starb. Damit haben die Tiere, welche mit Kapseln diluiert wurden, im Vergleich zu den Tieren, die mit HSA 5% diluiert wurden, den Versuch länger überlebt.

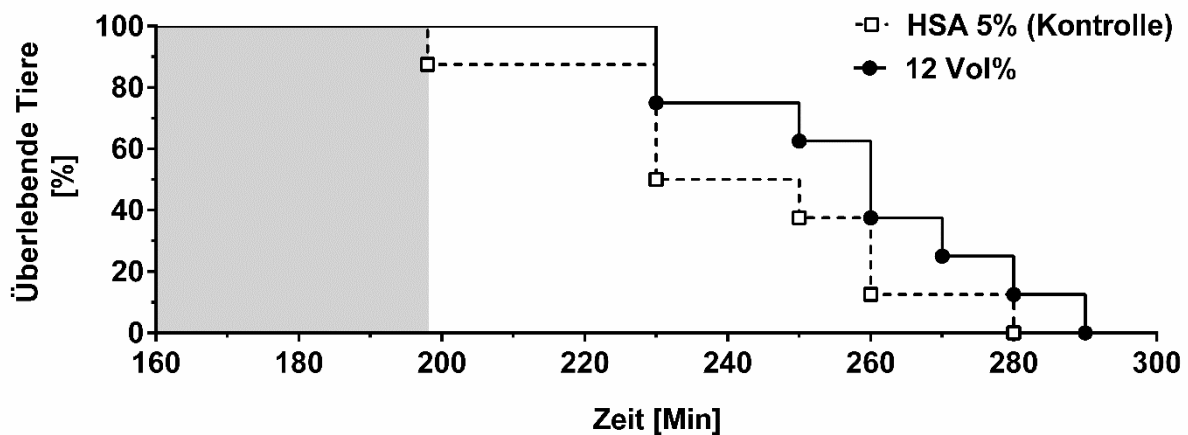


Abbildung 23: Auswirkung einer normovolämischen Hämodilution, mit HSA 5% (Kontrolle) oder 12 Vol% Kapseln, auf das Überleben der Tiere. Die Tiere wurden während der Hämodilution (grau markierter Bereich) durch elf normovolämische Dilutionsschritte auf einen finalen Hämatokrit von 5% gebracht. Dabei wurde jeweils über drei Minuten ein Blutvolumen von 3 ml entnommen und simultan durch das identische Volumen (HSA 5% (Kontrolle) oder 12 Vol% Kapseln) substituiert. Auf jede Dilution folgte zur Kreislaufstabilisierung eine 15 minütige Dilutionspause. Im Kaplan Meier Plot dargestellt sind n=8 Tiere je Gruppe. Mit $p < 0,05$ konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Nach 230 Minuten waren 50% der Kontrolltiere verstorben, wohingegen zu diesem Zeitpunkt noch 75% der Tiere aus der Kapselgruppe lebten. Im Folgenden werden deshalb die Parameter von Versuchsbeginn (-20 Minuten) bis zu Minute 230 miteinander verglichen.

4.8.2 Einfluss auf systemische Parameter

Während des Versuchs wurden durch das kontinuierliche Biomonitoring die systemischen Parameter mittlerer arterieller Blutdruck (MAP), Herzfrequenz, Atmung und Körperkerntemperatur aufgezeichnet (Abbildung 24). Dabei konnten zum Teil signifikante Unterschiede festgestellt werden.

Abbildung 24 A zeigt die Entwicklung des MAP während der Hämodilution. Beide Gruppen zeigten zu Beginn des Versuchs einen stabilen Blutdruck, der im Mittel auf einem Niveau von 90 mmHg lag. In der ersten Phase der Hämodilution fiel dieser Druck in beiden Versuchsgruppen kontinuierlich ab. Der MAP der Kontrollgruppe fiel bis Minute 108 auf $76,2 \pm 2$ mmHg ab, der MAP der Kapselgruppe fiel auf $65,7 \pm 2$ mmHg ab und war damit signifikant niedriger als der MAP der Kontrollgruppe. Der signifikante Unterschied zwischen den Gruppen konnte bis Minute 142 beobachtet

werden. Jedoch zeigte sich im weiteren Verlauf des Versuchs, dass die Kapselgruppe ihren MAP stabil auf etwa 50 mmHg halten konnte während der MAP der Kontrollgruppe immer weiter abfiel. Dies ist insbesondere nach der Hämodilution, in der Phase der Nachbeobachtung aufgefallen, so dass final (in Minute 230) mit $53,7 \pm 3$ mmHg ein höherer MAP für die Kapselgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe mit $36,8 \pm 5$ mmHg beobachtet werden konnte.

Die Herzfrequenz (Abbildung 24 B) zeigte keine signifikanten Differenzen zwischen den beiden Gruppen. Die Kontrollgruppe begann den Versuch mit einer Frequenz von 300 ± 9 Schläge/Minute. Eine ähnliche Herzfrequenz, mit 285 ± 10 Schläge/Minute, war für die Kapselgruppe zu verzeichnen. Die Frequenz beider Gruppen stieg im Verlauf des Versuchs an, sodass die Kontrolltiere final (in Minute 230) eine Herzfrequenz von 330 ± 4 Schläge/Minute aufwiesen und die Tiere der Kapselgruppe eine Frequenz von 352 ± 9 Schläge/Minute zeigten. Damit lagen beide Gruppen kontinuierlich in einem ähnlichen Frequenzbereich.

Die Atmung der Tiere beider Gruppen (Abbildung 24 C) blieb weitestgehend in identischen Bereichen konstant. So zeigte die Kontrollgruppe zu Beginn des Versuchs $43,0 \pm 2$ Atemzüge/Minute und die Kapselgruppe beinahe identische $43,0 \pm 1$ Atemzüge/Minute. Bis zum Ende der Hämodilution (Minute 198) blieb die Atemfrequenz, bis auf leichte Schwankungen, nahezu unverändert in beiden Gruppen, so dass in Minute 198 für die Kontrollgruppe eine Atemfrequenz von $44,0 \pm 3$ Atemzüge/Minute und für die Kapselgruppe eine Atemfrequenz von $42,0 \pm 2$ Atemzüge/Minute beobachtet wurde. Nach der Hämodilution reduzierte sich die Atemfrequenz in beiden Gruppen, so dass die Tiere der Kontrollgruppe in Minute 230 eine Atemfrequenz von $36,0 \pm 1$ Atemzüge/Minute erreichten und die Tiere der Kapselgruppe eine Atmung von $36,0 \pm 3$ Atemzüge/Minute zeigten.

Die Körperkerntemperatur der Tiere (Abbildung 24 D) zeigte für die Kontrollgruppe am Versuchsbeginn $37,2 \pm 0,1^\circ\text{C}$ und für die Kapselgruppe $37,5 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Über den Verlauf des Versuchs stieg die Temperatur in beiden Versuchsgruppen an, so dass in Minute 180 bei den Tieren der Kontrollgruppe eine Temperatur von $37,8 \pm 0,1^\circ\text{C}$ und bei den Tieren der Kapselgruppe eine Temperatur von $37,9 \pm 0,0^\circ\text{C}$ bestimmt wurde. Bereits am Ende der Hämodilution (ab Minute 180) fiel die Temperatur der Kontrollgruppe ab und diese Reduktion erfolgte kontinuierlich immer weiter, so dass die Tiere eine finale (Minute 230) Temperatur von $37,4 \pm 0,1^\circ\text{C}$ zeigten. Die Tiere der Kapselgruppe

hingegen konnten ihre Temperatur in Minute 210 und 220 signifikant höher halten und besaßen final (Minute 230) eine Temperatur von $37,8 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

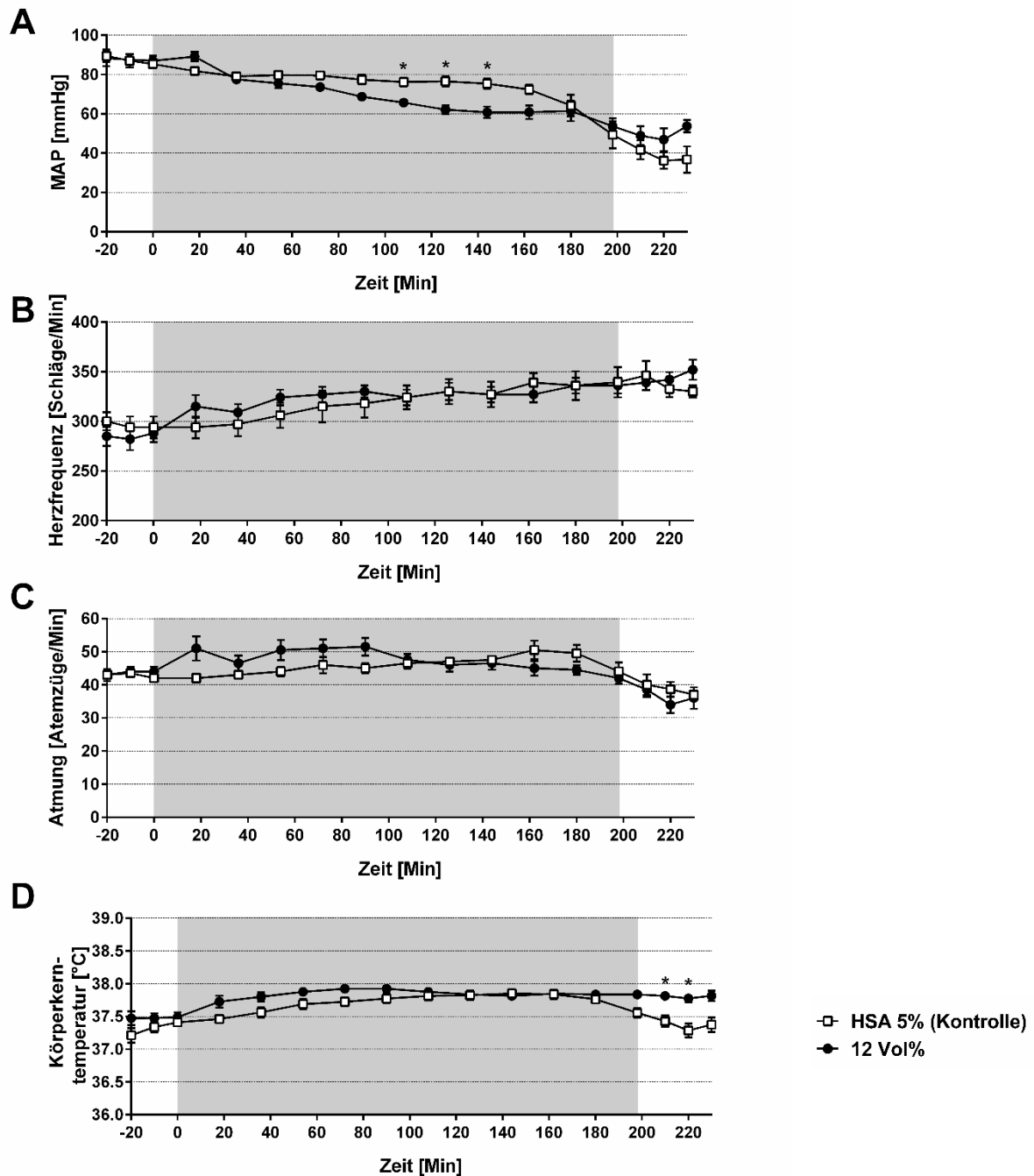


Abbildung 24: Auswirkung einer normovolämen Hämodylution (mit HSA 5% (Kontrolle) oder 12 Vol% Kapseln) auf den MAP (A), die Herzfrequenz (B), die Atmung (C) und die Körpertemperatur (D). Die Tiere wurden durch elf normovoläme Dilutionsschritte (hellgrau markierter Bereich) auf einen finalen Hämatokrit von 5% gebracht. Dabei wurde jeweils über drei Minuten ein Blutvolumen von 3 ml entnommen und simultan durch das identische Volumen (HSA 5% (Kontrolle) oder 12 Vol% Kapseln) substituiert. Auf jede Dilution folgte zur Kreislaufstabilisierung eine 15 minütige Dilutionspause. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus $n=8$. * $p < 0,05$ verglichen mit der Kontrollgruppe (HSA 5%).

4.8.3 Einfluss auf Säure-Base-Haushalt und metabolische Parameter

Zur Beurteilung des Säure-Base-Haushalts (pH-Wert, Sauerstoffpartialdruck (pO_2) und Kohlenstoffdioxidpartialdruck (pCO_2)) und der metabolischen Parameter (Glukose und Laktat) wurde den Tieren bei jedem der elf Dilutionsschritte sowie jede dreißigste Minute der Nachbeobachtungszeit eine Blutprobe entnommen und folgend eine Blutgasanalyse durchgeführt. Die Daten der Blutgasanalyse sind in diesem Abschnitt dargestellt (Abbildung 25). Sie zeigten zum Teil signifikante Veränderungen.

Der pH-Wert der Tiere beider Gruppen blieb von Versuchsbeginn bis zum Ende der Dilutionsphase (Minute 198) stabil auf einem ähnlichen Niveau (Abbildung 25 A). So variierte der pH-Wert der Tiere der Kontrollgruppe während dieser Zeit von pH 7,23 bis pH 7,28 und der pH-Wert der Tiere der Kapselgruppe von pH 7,21 bis pH 7,30. Im Anschluss an die Phase der Dilution (ab Minute 198) fiel der pH-Wert der Tiere der Kontrollgruppe ab, so dass am Versuchsende (in Minute 230) ein azidotischer pH-Wert von $pH\ 7,14 \pm 0,1$ gemessen wurde. Im Vergleich dazu lag der pH-Wert der Tiere, die mit 12 Vol% Kapseln diluiert wurden in Minute 230 über den pH-Werten der Kontrollgruppe bei $pH\ 7,25 \pm 0,1$.

Der pO_2 der Tiere aus der Kontrollgruppe blieb über den gesamten Versuchsverlauf unterhalb des pO_2 der Kapseltiere; dabei waren die Differenzen oftmals signifikant (Abbildung 25 B). Bereits unmittelbar nach Dilutionsbeginn (Minute 18) zeigte sich eine deutliche Differenz zwischen den beiden Gruppen in Höhe von 81 mmHg (Kontrollgruppe: $396,1 \pm 31$ mmHg, Kapselgruppe: $477,6 \pm 15$ mmHg). Diese Differenz nahm im Verlauf der Dilution weiter zu, so dass in Minute 126, 144 und 162 signifikante Unterschiede festgestellt wurden. In Minute 162 wurde die maximale Differenz von 137 mmHg im Vergleich der beiden Gruppen detektiert (Kontrollgruppe: $392,1 \pm 15$ mmHg, Kapselgruppe: $529,1 \pm 4$ mmHg). Dieser Trend setzte sich auch in der Nachbeobachtungszeit fort.

Gespiegelt zu den Daten des pO_2 stellten sich die Daten des pCO_2 dar (Abbildung 25 C). So blieb der pCO_2 der Tiere aus der Kontrollgruppe über den gesamten Versuchsverlauf oberhalb der Werte der Kapseltiere. Auch hier zeigte sich bereits unmittelbar nach Dilutionsbeginn (Minute 18) eine deutliche Differenz zwischen den beiden Gruppen in Höhe von 10 mmHg (Kontrollgruppe: $61,8 \pm 3$ mmHg, Kapselgruppe: $51,6 \pm 3$ mmHg). Bis zum Ende der Dilutionsphase blieb eine deutliche Differenz bestehen, welche in Minute 90 und 108 signifikant war. Erst nach der

Dilutionsphase am Versuchsende (Minute 230) näherten sich die gemessenen $p\text{CO}_2$ -Werte an, so dass für die Kontrollgruppe $47,2 \pm 1$ mmHg und für die Kapselgruppe $47,3 \pm 5$ mmHg bestimmt wurden.

Die Blutgasanalyse der Glukosekonzentration (Abbildung 25 D) zeigte am Versuchsbeginn für beide Gruppen einen ähnlichen Wert (Kontrollgruppe: $176,1 \pm 10$ mg/dL, Kapselgruppe: $165,6 \pm 10$ mg/dL). Die Glukosekonzentration erhöhte sich bis zur Minute 108 in der Kontrollgruppe minimal auf $213,2 \pm 12$ mg/dL und in der Kapselgruppe auf $203,1 \pm 11$ mg/dL. Von da an zeigten die Gruppen entgegengesetzte Verläufe der Glukosekonzentration. Die Glukose der Kontrollgruppe begann ab Minute 144 deutlich zu steigen, so dass sie ab Minute 162, im Vergleich zur Kapselgruppe signifikant erhöht war und in Minute 180 ihr Maximum mit $271,4 \pm 25$ mg/dL erreichte. Folgend fiel die Glukose zwar wieder ab (final in Minute 230: $158,5 \pm 52$ mg/dL), blieb aber über die gesamte Nachbeobachtungszeit oberhalb der Werte der Kapselgruppe. Die Kapselgruppe hingegen zeigte ab Minute 108 eine stetige Abnahme der Blutglukose, so dass final (in Minute 230) die minimale Konzentration von $27,8 \pm 7$ mg/dL bestimmt wurde.

Die Bestimmung der Laktatkonzentration im Blut der Tiere (Abbildung 25 E) zeigte von Versuchsbeginn bis kurz vor Ende der Dilutionsphase (Minute 180) für beide Gruppen annähernd identische Werte auf einem Niveau von maximal 2 mmol/L. Ab Minute 180 bis zum Versuchsende stieg die Konzentration des Laktats im Blut der Tiere der Kontrollgruppe deutlich an, so dass final (Minute 230) eine Laktatkonzentration von $6,8 \pm 1,5$ mmol/L gemessen wurde. Im Vergleich dazu war der Anstieg der Laktatkonzentration im Blut der Tiere der Kapselgruppe nur marginal. Final (Minute 230) erreichten die Tiere dieser Gruppe eine Laktatkonzentration von $3,3 \pm 0,6$ mmol/L.

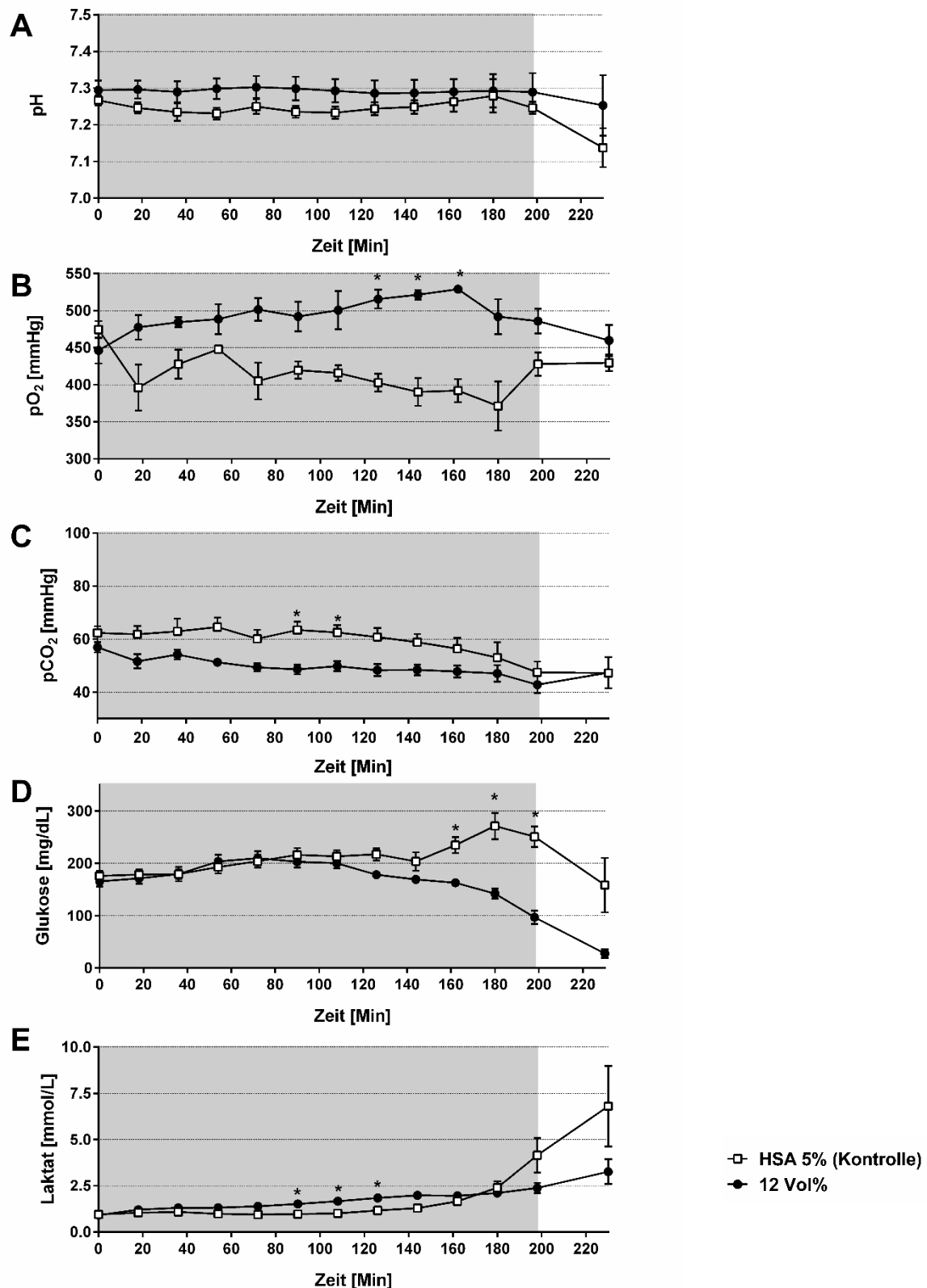


Abbildung 25: Auswirkung einer normovolämischen Hämodilution (mit HSA 5% (Kontrolle) oder 12 Vol% Kapseln) auf die mit Blutgasanalyse bestimmten Parameter pH-Wert (A), pO₂ (B), pCO₂ (C), Glukose (D) und Laktat (E). Die Tiere wurden durch elf normovolämische Dilutionsschritte (hellgrau markierter Bereich) auf einen finalen Hämatokrit von 5% gebracht. Dabei wurde jeweils über drei Minuten ein Blutvolumen von 3 ml entnommen und simultan durch das identische Volumen (HSA 5% (Kontrolle) oder 12 Vol% Kapseln) substituiert. Auf jede Dilution folgte zur Kreislaufstabilisierung eine

15 minütige Dilutionspause. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus $n=8$. * $p < 0,05$ verglichen mit der Kontrollgruppe (HSA 5%).

4.8.4 Einfluss auf Organschädigungsparameter

Die Auswertung der Plasmaenzymaktivitäten (Abbildung 26) im Blutplasma, als Anhaltspunkt für Organschädigung, zeigte zum Teil signifikante Unterschiede der Tiere mit Hämodilution durch 12 Vol% Kapseln im Vergleich zur HSA 5% Kontrollgruppe.

Die Hämodilution mit HSA 5% (Kontrolle) ergab über den gesamten Versuchsverlauf keine Aktivitätsveränderung der gemessenen Aktivitäten der Enzyme ALAT, ASAT, CK und LDH.

Während der Nachbeobachtung kam es in der mit 12 Vol% Kapseln behandelten Gruppe zu einem leichten Anstieg der Aktivität der Aminotransferase ALAT (Abbildung 26 A), welche von $58,4 \pm 3$ U/L am Versuchsbeginn auf $86,9 \pm 14$ U/L am Versuchsende (Minute 230) angestiegen war, aber im Vergleich zur Kontrolle kein signifikant erhöhtes Niveau erreichte. Die Aminotransferase ASAT (Abbildung 26 B) zeigte in Minute 126 eine signifikante Aktivitätserhöhung durch einen Anstieg von $60,3 \pm 4$ U/L am Versuchsbeginn auf $118,1 \pm 9$ U/L. Diese Aktivität erhöhte sich bis zum Versuchsende (Minute 230) kontinuierlich bis auf $350,5 \pm 23$ U/L und blieb damit weiterhin signifikant erhöht. Ähnlich wie der Verlauf der Aminotransferase ASAT stellte sich die Enzymaktivität von LDH dar (Abbildung 26 C). Die Aktivität des Enzyms stieg ebenfalls stetig an, so dass ab Minute 90 ein signifikanter Unterschied zwischen Kapsel- und Kontrollgruppe detektiert werden konnte (Kontrollgruppe: 112 ± 23 U/L, Kapselgruppe: 210 ± 28 U/L). Final (Minute 230) konnte für die Aktivität der LDH nach Hämodilution mit 12 Vol% Kapseln ein Wert von 1060 ± 150 U/L bestimmt werden. Eine Erhöhung der plasmatischen Aktivität von CK (Abbildung 26 D) setzte unmittelbar nach Dilutionsbeginn ein und erreichte in Minute 54 ein, im Vergleich zur Kontrollgruppe, signifikant erhöhtes Niveau. Final (Minute 230) erreichte die Aktivität der CK in der Kapselgruppe $724,8 \pm 24$ U/L, im Vergleich dazu zeigten die Tiere der Kontrollgruppe eine CK-Aktivität von $128,8 \pm 28$ U/L.

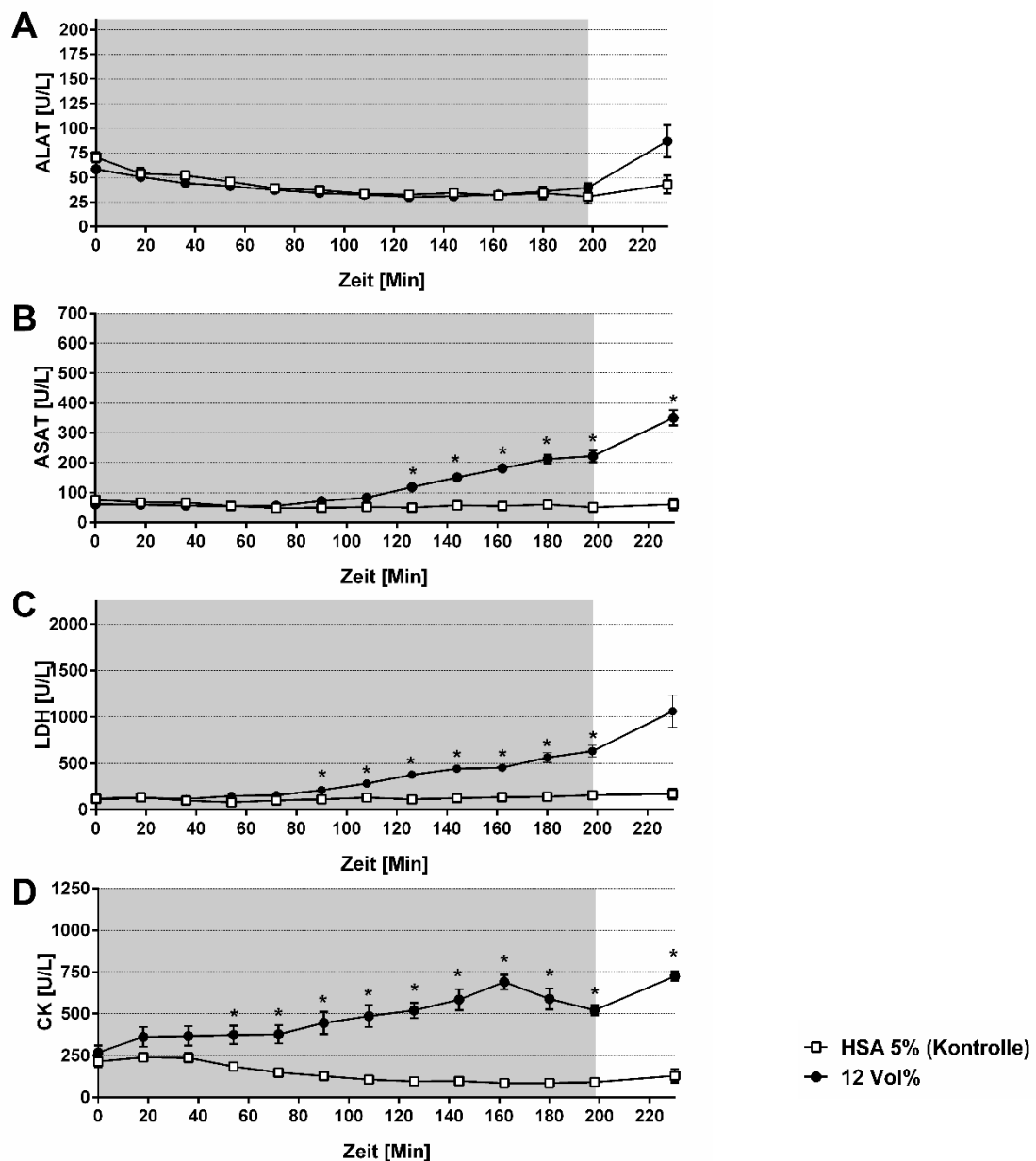


Abbildung 26: Auswirkung einer normovolämen Hämodilution (mit HSA 5% (Kontrolle) oder 12 Vol% Kapseln) auf die Organschädigungsparameter ALAT (A), ASAT (B), LDH (C) und CK (D). Die Tiere wurden durch elf normovoläme Dilutionsschritte (hellgrau markierter Bereich) auf einen finalen Hämatokrit von 5% gebracht. Dabei wurde jeweils über drei Minuten ein Blutvolumen von 3 ml entnommen und simultan durch das identische Volumen (HSA 5% (Kontrolle) oder 12 Vol% Kapseln) substituiert. Auf jede Dilution folgte zur Kreislaufstabilisierung eine 15 minütige Dilutionspause. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus $n=8$. * $p < 0,05$ verglichen mit der Kontrollgruppe (HSA 5%).

5 Diskussion

5.1 Kapselsynthese und Gestalt

5.1.1 Standardsynthese

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Perfluorodecalin gefüllte Albuminkapseln synthetisiert. Die gewählte Synthesemethode führte zu Kapseln mit einer kreisrunden Struktur, die einen Hohlraum umschlossen, der mit Perfluorodecalin gefüllt war. Bei den Untersuchungen zur Form zeigten sich gut separierte Kapseln, die in dem zur Untersuchung angewandten Medium gleichmäßig verteilt waren (Abbildung 10). Da aus anderen Studien bekannt ist, dass die Verwendung von Ultraschallwellen an der Grenzfläche von wässrigen Proteinlösungen und unpolaren Flüssigkeiten zur Herstellung von Mikrosphären verwendet werden kann [58], wurde zur Synthese die Technik der Ultraschall Behandlung verwendet. Außerdem wurde diese Methode der Synthese bereits für andere Perfluorocarbone angewandt (Perfluorononan [58] sowie eine Mischung aus Perfluorobutyltetrahydrofuran und Perfluorotributylamin [8]). Andere Methoden der Synthese, die zur Herstellung von Albuminpartikeln verwendet werden können, wie z. B. die thermale oder chemische Stabilisierung, kamen hier nicht in Frage. Zum einen würde die, für die thermische Stabilisierung, notwendige Temperatur von 175-180°C [42] dazu führen, dass alle Albuminmoleküle (die der Kapseln als auch die des umgebenen Mediums) denaturieren und miteinander vernetzen, zum anderen liegt die Siedetemperatur des Perfluorodecalins bei 142°C, so dass die hohe Synthesetemperatur zur Verdampfung des flüssigen Perfluorodecalins führen würde. Im Gegensatz zu der thermischen Stabilisierung wäre bei der chemischen Stabilisierung keine Temperaturerhöhung notwendig, allerdings werden zur chemischen Stabilisierung üblicherweise gesundheitsschädliche Chemikalien, wie etwa Glutaraldehyd, eingesetzt. Diese würden dann im Fall einer *in vivo* Verabreichung zu unerwünschten Nebenwirkungsprofilen führen, so dass ein Einsatz in dem hier angestrebten Ziel unwahrscheinlich wäre. Zudem bestünde auch hier die Problematik der Proteindenaturierung bzw. Vernetzung freier Albuminmoleküle. Ein zusätzlicher Vorteil bei der Synthese mittels Ultraschallwellen ist die Tatsache, dass die Behandlung von Lösungen mit hochenergetischem Ultraschall (>20 kHz) Bakterien abtöten kann [65; 66]. Da bei der im Rahmen dieser Arbeit angewandten Synthese mit 24 kHz Ultraschall gearbeitet wurde, waren weitere Schritte der Sterilisation zur Herstellung von aseptischen Kapselsuspensionen nicht

notwendig. Dies konnte auch anhand von Untersuchungen zur mikrobiellen Stabilität gezeigt werden [60].

5.1.2 optimierte Kapselsynthese

Da die bis dato standardmäßig verwendete Synthese (90 Sekunden kontinuierliche Beschallung unter Kühlung in einem 15 ml Falcon mit 6 ml Gesamtvolumen) zu Kapseln führte, die sich vermehrt in der Milz ablagerten, wurde die Kapselsynthese optimiert.

Die Ablagerung der Kapseln fiel in der histologischen Begutachtung der Milzen nach intravenöser Infusion von 64 Vol% Kapseln in strukturellen Veränderungen der roten Pulpa der Milz auf (Abbildung 16 E und F). Die rote Pulpa der Milz dient der Eliminierung von Erythrozyten, die ihre maximale Zirkulationsdauer erreicht haben. Das Blut wird dazu aus den Kapillaren in die Pulpastränge geleitet. Von dort gelangt es in weite, dünnwandige Blutgefäße, die sogenannten Milzsinus. Diese Milzsinus besitzen ein Endothel mit sogenannten interendothelialen Schlitzen, das sind Räume zwischen den Gefäßwandzellen durch die das Blut geleitet wird. Die interendothelialen Schlitze besitzen eine Größe von etwa 1890x650 nm [67]. Erythrozyten besitzen eine Größe von etwa 7µm, das heißt, um diese interendothelialen Schlitze zu durchdringen müssen sie stark deformierbar sein. Sind sie zu alt und damit nicht mehr deformierbar, können Erythrozyten die Schlitze nicht mehr passieren und verbleiben in den Pulpasträngen, wo sie unmittelbar von Makrophagen aufgenommen und eliminiert werden. Andere Arbeiten konnten bereits zeigen, dass die Milz als Filterorgan Nanopartikel aus dem Gefäßsystem eliminiert [68; 69]. Auch die Albuminkapseln müssen diese Schlitze passieren und sollten entweder ähnlich flexibel wie ein Erythrozyt oder zumindest klein genug sein, um diese zu durchdringen. Die bis dato standardmäßig verwendete Synthese (90 Sekunden kontinuierliche Beschallung unter Kühlung in einem 15 ml Falcon mit 6 ml Gesamtvolumen) führte zu Kapseln, die diese Schlitze nicht unbedingt durchdringen konnten (mittlerer Durchmesser von 1028 nm, geringste Durchmesser 224 nm, maximal gemessene Durchmesser 2466 nm; Abbildung 11, mit Stern markiert).

Die Ergebnisse in Abschnitt 4.2 zeigen, dass die Erhöhung der Ultraschalldauer auf 10 Minuten und die gleichzeitige Reduktion des Gesamtvolumens um 50% zu einer Reduktion des Kapseldurchmessers führte. Dies ist kongruent zu Untersuchungen von Arshady et al., die zeigen konnten, dass eine längere Beschallung mit hoher

Ultraschallintensität zu feiner verteilten Tröpfchen mit einer höheren Homogenität in einer Emulsion führen [70]. Der maximale Kapseldurchmesser nach Anwendung der optimierten Synthese lag bei 692 nm und somit klein genug, um die interendothelialen Schlitze der Milzgefäße zu durchdringen. Auch Han et al. zeigten 2008, dass eine längere Beschallung von Protein-Mikrosphären zu geringeren Durchmessern und minimierten Größenverteilungen führt [71]. Ebenso konnten sie in ihrer Arbeit darstellen, dass in den verschiedenen Regionen um die Ultraschallsonde Protein-Mikrosphären mit unterschiedlichen Größen abzugrenzen sind. Abbildung 27 zeigt einen Auszug aus der Arbeit, indem dargestellt ist welche Mikrosphärengößen in welcher Region auftreten. Demnach entstehen die kleinsten Partikel direkt unterhalb der Sonde. Verringert man nun das Volumen, der zur Synthese eingesetzten Flüssigkeiten, sollten sich auch die unerwünschten Regionen A und E neben der Ultraschallsonde minimieren, so dass sich mehr Material in der Region unterhalb der Sonde (Region B, C und D) befindet und somit vermehrt kleinere Kapseln entstehen. Durch die verlängerte Synthesezeit und die Reduktion des zur Synthese eingesetzten Flüssigkeitsvolumens konnte hier die Albuminkapselgröße erfolgreich minimiert werden, wie in Abbildung 11 zu sehen ist.

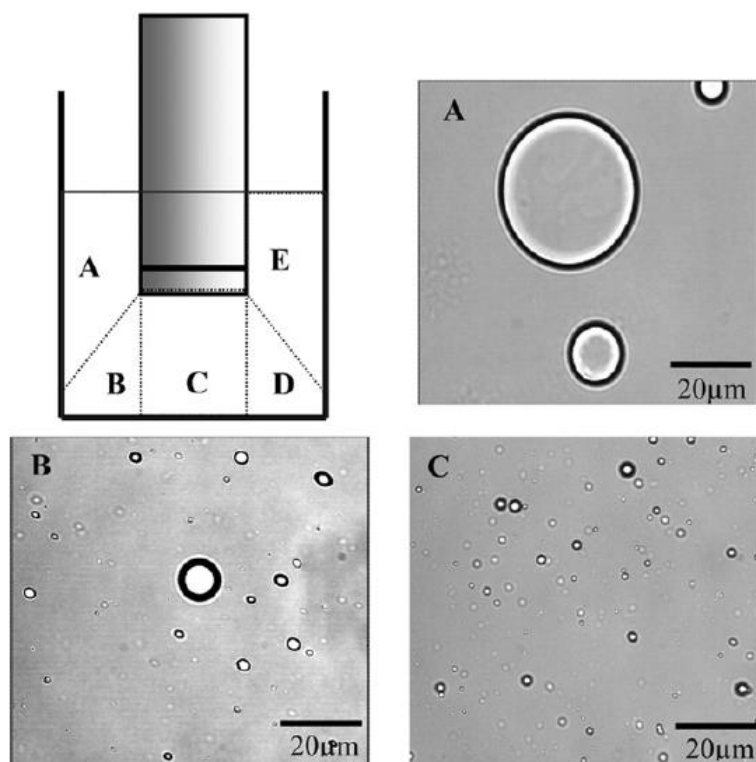


Abbildung 27: Größenverteilung von Protein-Mikrosphären in den verschiedenen Regionen um die Ultraschallsonde (innerhalb des Synthesegefäßes). Aus [71].

5.2 Langzeitstabilität

Im Hinblick auf den finalen Einsatz der, im Rahmen dieser Arbeit, entwickelten Perfluorodecalin gefüllten Albuminkapseln ist es wichtig, dass sie eine möglichst lange Lagerfähigkeit, ohne aufwendige Kühlungsprozesse, aufweisen können. Die in dieser Arbeit untersuchte Langzeitstabilität bei Raumtemperatur zeigte, dass Albuminkapseln synthetisiert und gelagert in Albuminlösung (HSA 5%) den geringsten Größenanstieg zeigen. Im Vergleich dazu war bei der Lagerung in NaCl 0,9% ein deutlich höheres Größenwachstum zu beobachten (Abbildung 12). Diese Beobachtung lässt darauf deuten, dass Elektrolyte die Agglomeration und damit das Größenwachstum der Kapseln beschleunigen, wohingegen durch die Anwesenheit von Albuminmolekülen dieses Wachstum unterbunden werden kann. Diesen Eindruck konnten auch Lochmann et al. im Jahr 2005 bei ähnlichen Albuminnanopartikeln gewinnen [72]. Zu erwähnen ist, dass die Anwesenheit von Elektrolyten und Albuminmolekülen auch am ehesten den physiologischen Bedingungen entspricht. Daher sind die Bedenken, im Hinblick auf ein mögliches Wachstum der Kapseln innerhalb des Gefäßsystems durch das umgebene Medium, als eher gering einzuordnen.

Neben der ermittelten Größenverteilung wurde auch das Maß für die breite der Verteilung bestimmt, der sogenannte Polydispersitätsindex (PDI). Dabei ist ein PDI von 0,0 bei monodispersen Partikeln vor zu finden, ein PDI von 0,1-0,2 besteht bei engen Verteilungen, ein PDI von 0,3-0,5 bei breiteren Verteilungen und ab 0,5 gilt die Verteilung als sehr breit. Interessanterweise zeigten die Kapseln in Albuminlösung, im Vergleich zu Kapseln in H₂O (0,3) und NaCl 0,9% (0,3), mit einem PDI um 0,6 eine sehr breite Verteilung, obgleich das Größenwachstum hier vernachlässigbar gering war.

Auch die Messung des Zetapotenzials gibt Hinweise auf die Stabilität der Kapseln in den verschiedenen Medien. Eine kolloidale Dispersion gilt als stabil, wenn die elektrostatischen Wechselwirkungen der Partikel, die der anziehenden Van der Waals-Kräfte überlagern [73]. Während der Lagerung oder spätestens bei der intravenösen Verabreichung werden die Kapseln Kationen, Anionen und nichtionischen Molekülen ausgesetzt sein, dadurch kann die elektrostatische Stabilisierung und damit das Zetapotenzial beeinflusst werden. Generell gilt eine Dispersion als elektrostatisch stabil, wenn das Zetapotenzial eine Größe von

mindestens ± 30 mV (optimalerweise ± 60 mV) zeigt. An Tag 1 nach der Synthese zeigten die Kapseln in H_2O mit einem Zetapotenzial von rund -30 mV demnach eine stabile Dispersion, ähnlich wie Albuminpartikel anderer Studien [74], die ebenfalls in H_2O gelagert worden waren. Über die Zeit (Tag 3 und 7 nach der Synthese) halbierte sich das Zetapotenzial beinahe, so dass die Dispersion nicht mehr als stabil einzuordnen war. Vermutlich kam es, aufgrund von geringer werdenden elektrostatischen Abstoßungen zwischen den Kapseln, zu einem Anstieg des Kapseldurchmessers bei Lagerung in H_2O . Kapseln gelagert in NaCl 0,9% zeigten bereits von Versuchsbeginn an ein sehr geringes Zetapotenzial (um -8 mV), so dass auch hier das Kapselwachstum vermutlich auf eine zu geringe elektrostatische Stabilität zurück zu führen ist. Die Messung des Zetapotenzials der Kapseln in HSA 5% war, aufgrund von technischen Limitationen, nicht möglich. Vermutlich hat der abschirmende Effekt des Albumins zu einer stabilen Dispersion geführt, denn die Größe der Kapseln gelagert in HSA 5% blieb weitestgehend stabil. Es ist denkbar, dass die freien Albuminmoleküle aus dem Medium an die Kapseln anlagern und somit die elektrostatische Stabilisierung begünstigen bevor es zu einer Aggregation der Kapseln kommen kann. Dieser Effekt (neben der Anlagerung anderer Makromoleküle wie Fibronektin oder Polysaccharide) gewinnt insbesondere dann an Bedeutung, wenn die Kapseln bei einer intravenösen Verabreichung mit Blut in Kontakt kommen. Denn die durch Anlagerung von Albumin entstehende negative Ladung der Kapseloberfläche kann dazu führen, dass die Phagozytose der Partikel minimiert wird [74].

5.3 Untersuchung zur Toxizität von 64 Vol% und optimierten Kapseln

Die intravenös verabreichte Menge an Kapseln oder Kontrolllösung entsprach in diesem Versuch etwa 1/6 des Gesamtblutvolumens der Ratte. Vergleicht man dieses Volumen mit der Anwendung von Erythrozyten-Konzentrat (EK, ca. 280 ml) bei Patienten, entspricht die Menge in etwa dem Einsatz von 3 EKs (5 L Blut, $1/6 = 833$ ml). Generell kann man sagen, dass alle Tiere die intravenöse Verabreichung der verabreichten Lösungen vertragen haben. Die Kontrolllösung (HSA 5%) entsprach der Trägerlösung der Kapselsuspensionen, dabei handelt es sich um ein bereits zugelassenes Arzneimittel der Firma Baxalta. Optimierte Kapseln wurden in diesem Versuch eingesetzt, da nach der Optimierung der Kapselsynthese erneut die potentiell toxischen Effekte untersucht werden sollten. Wie in Wrobeln et al. gezeigt, erreichen

die 64 Vol% Kapseln eine ähnliche Sauerstofftransportkapazität wie andere relevante PFC-basierte Sauerstoffträger (Perftoran® und Oxygent®) [60]. Deshalb wurden die 64 Vol% Kapseln in diesem Versuch auf potentiell toxische Effekte untersucht.

5.4.1 Einfluss auf systemische Parameter

In der Literatur wurde die intravenöse Verabreichung von Perfluorocarbonen mehrfach mit einer Hypotension in Zusammenhang gebracht [75-77]. Auch kapselbasierte Sauerstoffträger mit PFD-Füllung zeigten in der Vergangenheit eine massive Hypotension nach intravenöser Verabreichung in der Ratte [14; 15]. Zwar ist auch im Rahmen dieser Arbeit eine moderate Hypotension zu beobachten (Abbildung 13 A), im Vergleich zu den in der Literatur beschriebenen Druckabfällen blieb der MAP, trotz transienter Hypotension unmittelbar nach Infusionsbeginn der Kapseln (sowohl 64 Vol% als auch optimierte Kapseln), aber stets innerhalb der physiologischen Toleranz.

Die Verabreichung von 64 Vol% Kapseln führte zu einem transienten Anstieg der Atemfrequenz unmittelbar nach Beginn der Infusion (Abbildung 13 C), dieser Anstieg konnte sowohl bei der Kontrolle als auch bei Infusion von optimierten Kapseln nicht beobachtet werden. Die durch die 64 Vol% intravenös verabreichte Menge an PFD entspricht etwa 3,3 g/kg Körpergewicht. Im Vergleich dazu entsprach die Menge an PFD bei den optimierten Kapseln etwa 1,7 g/kg Körpergewicht. Das verwendete Inhalationsanästhetikum (Isofluran) ist chemisch gesehen mit den Perfluorocarbonen verwandt, denn auch dieses Molekül ist mehrfach fluoriert. Die daraus resultierende Hydrophobizität bei gleichzeitiger Lipophobizität, wie bei einem Perfluorocarbon, verleiht dem Isofluran eine gute Löslichkeit in Perfluorocarbonen. Beim Blick auf die notwendigen Konzentrationen von Isofluran (Abbildung 13 E) fällt auf, dass diese kongruent mit dem Anstieg der Atemfrequenz eine Hochdosierung erforderte. Denkbar wäre also, dass es bei der Anwendung von 64 Vol% Kapseln, aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit, zu einer vermehrten Aufnahme des Isoflurans in die Kapseln gekommen ist. Damit wäre dieser Teil des Anästhetikums aus dem Gefäßsystem eliminiert und könnte seine eigentliche Funktion nicht mehr ausüben. Als Folge stieg die Atemfrequenz an. Die Menge an PFD der optimierten Kapseln schien dahingegen zu gering um Isofluran in großer Menge aufzunehmen und dadurch die Atmung zu beeinflussen. Die Löslichkeit von Anästhetika in PFCs konnte bereits im Jahr 2007 durch Cabrales et al. in ihrer Arbeit beschrieben werden [78]. Allerdings sollte erwähnt

werden, dass alle aufgezeichneten Werte stets innerhalb der physiologischen Toleranz lagen.

5.4.2 Einfluss auf Säure Base Haushalt, metabolische Parameter und Organintegrität

Wie erwartet führte die Verabreichung der Kapseln (64 Vol% und optimierte Kapseln) zu einem Anstieg des pO_2 im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 14 C). Das demonstriert anschaulich die Fähigkeit der Kapseln, Sauerstoff in die Zirkulation einzubringen und dadurch den pO_2 zu erhöhen. Ebenso kann durch einen, im Vergleich zur Kontrolle, gesenkten pCO_2 darauf geschlossen werden, dass die Kapseln in der Lage sind, angefallenes Kohlendioxid in ausreichender Menge aus dem Gefäßsystem abzuführen (Abbildung 14 D).

Für beide Kapselgruppen ist, im Vergleich zum jeweiligen Ausgangswert am Versuchsbeginn, ein Anstieg der plasmatischen Laktatkonzentration zu verzeichnen (Abbildung 14 E). Der prominenteste Weg zur Entstehung von Laktat ist die anaerobe Glykolyse. Da aber in diesen Gruppen, aufgrund des ausreichend hohen pO_2 , eine Hypoxie als Ursache für den Laktatanstieg auszuschließen ist, scheint eine andere Ursache diesen Anstieg erklären zu müssen.

Die Konzentrationen von Laktat (Abbildung 14 E) und Glukose (Abbildung 14 F) korrelieren invers. Eine attraktive Hypothese wäre, dass eine übermäßige Glykolyse den Laktat-Anstieg ausgelöst hat. Abbildung 28 zeigt ein Schaubild zur Erläuterung der Abläufe. Die durch die Glykolyse anfallenden und für die Atmungskette notwendigen Reduktionsäquivalente werden aus dem Zytosol mit Hilfe eines gewebespezifischen Shuttles (Malat-Aspartat-Shuttle vor allem in Herz, Leber und Niere; Glycerin-3-Phosphat-Shuttle zusätzlich in Gehirn und Muskel) über die innere Mitochondrienmembran in die Mitochondrien gebracht. Es ist bekannt, dass dieser Shuttle bei vermehrter Glykolyse überladen werden kann und dann seine Funktion verliert [79]. Als Folge einer Überladung des Shuttles wäre denkbar, dass das im Zytosol der Zelle anfallende NADH/H⁺ durch die Reduktion von Pyruvat zu Laktat abgebaut wurde. Dies hätte dann zum Anstieg der Laktatkonzentration in den Blutgefäßen geführt.

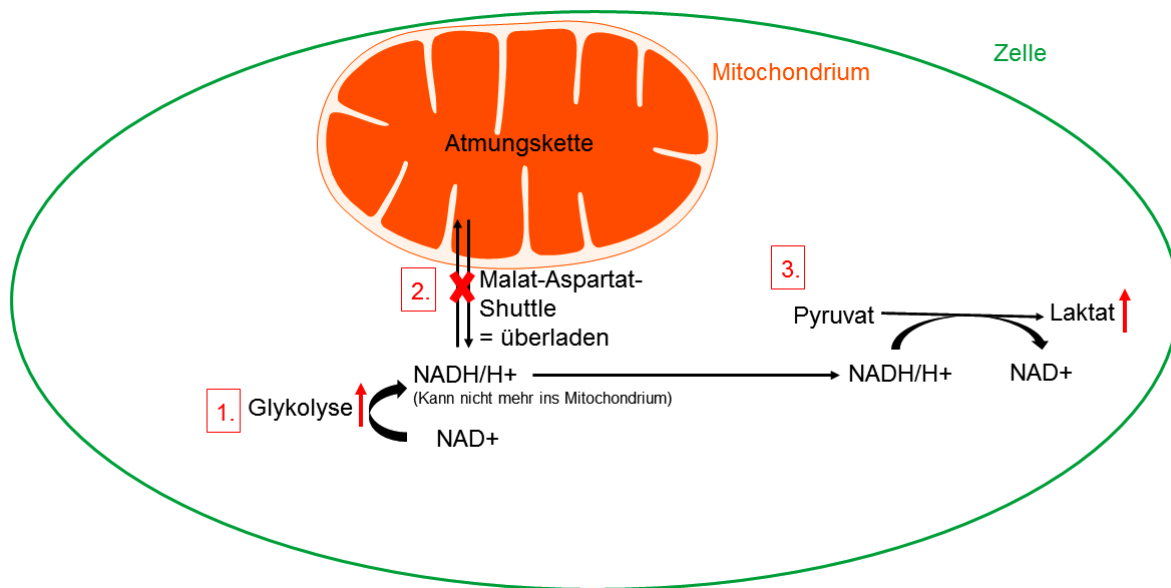


Abbildung 28: Erläuterung zum Laktatanstieg bei reziproker Korrelation der Glukosekonzentration. Eine erhöhte Glykolyse (1.) führte vermutlich zu einer Überladung des Malat-Aspartat-Shuttles (2.) wie in Phypers et al. beschrieben [79]. Als Folge verlor der Shuttle vermutlich seine Funktion und das (durch die Glykolyse) anfallende NADH/H⁺ wurde durch die Reduktion von Pyruvat zu Laktat abgebaut (3.).

Analog dazu konnte während des Versuchs ein Anstieg der Plasmaaktivität der mitochondrialen ASAT, die ein essentielles Enzym für den Malat-Aspartat-Shuttle in Herz, Leber und Niere darstellt, beobachtet werden (Abbildung 15 A). Nach der hier aufgeführten Hypothese ist denkbar, dass als Folge der Shuttle-Überladung Zellen dieser Gewebe zu Grunde gegangen sind und das Enzym so in das Blutplasma gelangen konnte. Da der nierenspezifische Schädigungsmarker Kreatinin keinerlei Auffälligkeiten zeigte (ohne Abbildung) und auch die histologische Begutachtung der Niere ohne Befund blieb, ist eine Schädigung der Niere aber eher unwahrscheinlich. Abbildung 15 C zeigt einen Anstieg der CK nach Infusion von Kapseln (optimierte und 64 Vol% Kapseln). Als Quelle für einen CK Anstieg kann durchaus das Myokard in Frage kommen, wobei auch der Skelettmuskel oder das zentrale Nervensystem mögliche CK Quellen darstellen. Anhand einer Isoenzym Bestimmung ist es möglich die CK Quelle genauer zu lokalisieren. Im Rahmen der Arbeit von Dr. Laudien wurde, nach intravenöser Verabreichung von Albuminkapseln, eine Bestimmung der CK-Isoenzyme durchgeführt [80], dabei konnten sowohl das Herz als auch das zentrale Nervensystem als Quellen für den Schädigungsparameter ausgeschlossen werden.

Deshalb scheint eine Schädigung von Herz und zentralem Nervensystem, auch im Rahmen dieser Arbeit, eher unwahrscheinlich zu sein.

Generell wird in der Blutbahn angefallenes Laktat in der Leber wieder zu Pyruvat oxidiert wodurch seine Konzentration abfällt. Im Falle einer pathologischen Veränderung der Leber kann sie diese Funktion nicht mehr ausüben und das Laktat konzentriert sich in der Blutbahn auf. Die Histopathologische Beurteilung der Leber zeigte für die Kapselgruppen zwar keine Auffälligkeiten, im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 18), allerdings ist bei der Betrachtung des leberspezifischen Organschädigungsparameters ALAT ein signifikanter Anstieg für die Kapselgruppen, im Vergleich zu der Kontrolle, zu sehen (Abbildung 15 A). Die intrazelluläre ALAT kann nur dann im Plasma detektiert werden wenn Hepatozyten geschädigt wurden, daher ist davon auszugehen, dass Zellen der Leber durch die Kapselinfusion beschädigt wurden. Eine derartige Schädigung der Hepatozyten würde auch den Anstieg der Aktivität von ASAT erklären. Die pathologischen Veränderungen der Leber führten möglicherweise dazu, dass das Laktat nicht ausreichend aus dem Gefäßsystem eliminiert werden konnte. Dennoch scheint diese Schädigung eher gering zu sein und deshalb zeigen sich vermutlich keine Befunde in der HE-Färbung. Veränderungen der Leber durch PFCs sind in der Literatur mehrfach beschrieben und werden durch die Einlagerung von PFC haltigen Produkten in die Kupffer-Zellen der Leber begründet [81-85].

Wie bereits erwähnt zeigt der Verlauf der Glukosekonzentration eine reziproke Korrelation, im Vergleich zu der Laktatkonzentration (Abbildung 14 F). Dies könnte ein weiteres Indiz für eine mögliche pathologische Veränderung der Leber darstellen. Bei einem Abfall der Glukose sollte die Leber unter physiologischen Bedingungen in der Lage sein, durch Glykogenolyse oder Glukoneogenese einen temporären Ausgleich zu schaffen.

Lutz et al. konnten 1980 nach Verabreichung einer PFC Emulsion in die Ratte ebenfalls einen Anstieg der Aktivitäten von ASAT und ALAT zeigen. Die Plasmaenzymbestimmung wurde bei dieser Studie über acht Tage durchgeführt und bereits 24 Stunden nach der PFC Verabreichung hatte die Aktivität der Transaminasen wieder das physiologische Niveau erreicht. Daraus haben sie geschlussfolgert, dass die Leber keinen Schaden erlitten hat und der Anstieg lediglich auf die Einlagerung des PFCs in die Zellen der Leber zurück zu führen ist [85]. Eventuell ist der im Rahmen

dieser Arbeit beobachtete Anstieg der Plasmaenzyme ebenfalls transient und damit auch die Abnahme der Glukose im Plasma. Um dies zu bestätigen müsste allerdings ein deutlich verlängertes Versuchsdesign angewendet werden.

Des Weiteren sollte man bei der Betrachtung der katabolen Stoffwechselvorgänge auch die initiierenden Faktoren berücksichtigen. Auslöser für den in der Leber stattfindenden Prozess der Glykogenolyse, bei dem Glykogen abgebaut wird, sind Glukokortikoide. Albumin ist dafür bekannt Liganden zu binden [41; 86]. In der Kapselwand befinden sich eine Vielzahl von Albuminmolekülen auf engstem Raum, so dass an dieser Stelle eine erhöhte Anlagerung von Liganden stattfinden könnte. Deshalb ist denkbar, dass die für die katabolen Stoffwechselvorgänge notwendigen Glukokortikoide an die Wand der Kapseln gebunden wurden und somit für die Auslösung der Stoffwechselprozesse nicht mehr zur Verfügung standen und es als Folge zu einem Abfall der Glukose kommen konnte.

Wie bereits oben erwähnt konnte für beide Kapselgruppen ein Anstieg des Schädigungsparameters ASAT verzeichnet werden. Da ASAT zum größten Teil in den Mitochondrien lokalisiert ist, gelangt sie nur bei umfangreicher Zellschädigung ins Blut. Ein möglicher Grund einer derartigen mitochondrialen Schädigung könnte (neben der genannten Überladung des Shuttles) eine durch Hyperoxie bedingte Oxidation der Häm-Gruppen in den Cytochromen der Atmungskette sein. Arbeiten unserer Arbeitsgruppe konnten zum einen zeigen, dass Cytochrome der isoliert perfundierten Niere durch den gelösten Sauerstoff in den Kapseln oxidiert werden [87] und zum anderen, dass es möglich ist den Redoxzustand des Eisens in den Hämoglobinmolekülen durch den in den Kapseln gelösten Sauerstoff zu verändern [59]. Generell ist die Toxizität von Sauerstoff aus der hyperbaren Beatmung bekannt und wird auf der daraus resultierenden vermehrten Bildung von freien Sauerstoffradikalen begründet [88]. Die zellulären Mechanismen zur Beseitigung dieser Radikale (z. B. Peroxisomen oder der Radikalfänger Gluthation) können überlastet sein und dann entsteht die genannte Toxizität [89; 90].

Der Anstieg des Plasmaenzyms LDH (Abbildung 15 D) zeigt eine generelle Schädigung von Zellen an und deutet daher nicht spezifisch auf ein Organ hin, passt allerdings zu einem möglichen Schaden der Hepatozyten.

Der pH-Wert (Abbildung 14 A) beider Kapselgruppen konnte durch die Tiere über den gesamten Versuchsverlauf stabil gehalten werden, wohingegen die Tiere der Kontrollgruppe einen temporären Abfall der gemessenen Blut pH-Werte zeigten. Dieses deutet darauf hin, dass die Kapseln einen positiven Einfluss auf den Säure-Base Haushalt nehmen. Der gemessene Base Excess (Abbildung 14 B) zeigte für alle Versuchsgruppen deutliche Veränderungen über den Versuchsverlauf, dabei sollte allerdings erwähnt werden, dass der Base Excess trotz des Abfalls in allen Versuchsgruppen stets im physiologischen Bereich (+3 mmol/L bis -3 mmol/L) lag.

5.4.3 Histologische Veränderungen durch Kapselinfusion- Leber und Milz

In der Literatur gibt es nur wenige Aussagen über den Einfluss von intravenös verabreichten Albuminkapseln auf Gewebeschädigung. Vielmehr wird die Arzneistofffreisetzung [46] sowie die biologische Degradation [91] der Partikel untersucht. Unumstritten ist allerdings, dass PFC haltige Partikel in erster Linie durch Kupffer-Zellen der Leber und Makrophagen der Milz aufgenommen werden [81-85]. Die histologische Beurteilung der Organe nach intravenöser Infusion von Kapseln zeigte Veränderungen der Organstruktur der Milz, speziell im Bereich der roten Pulpa. Diese war von großlumigen Hohlräumen durchzogen (Abbildung 16 C, D, E, F). Wie bereits in Abschnitt 5.1.2 erwähnt tritt die Milz als Filterorgan, aufgrund des dort vorherrschenden enormen Blutflusses, intensiv mit den Kapseln in Kontakt. Dabei konnte die strukturelle Veränderung der Milz sowohl nach Infusion von 64 Vol% Kapseln, die mittels Standardsynthese hergestellt worden sind, als auch nach Infusion von optimierten Kapseln beobachtet werden.

Um dieses Geschehen genauer zu untersuchen erfolgte eine spezifische Makrophagenfärbung. Diese verdeutlichte, dass die Makrophagen der Kapseltiere im Vergleich zu den Kontrolltieren enorm an Volumen gewonnen haben und auch eine veränderte Struktur zeigten (Abbildung 17). Bei genauerer Betrachtung war zu beobachten, dass die Makrophagen nach Kapselinfusion eine „schaumige“ Gestalt annahmen und der Inhalt der Makrophagen nicht gefärbt war. Die fehlende Färbung des Inhalts lässt vermuten, dass es sich um eingelagertes PFC handelt, denn dieses wird weder von HE noch von der spezifischen Makrophagenfärbung markiert. Sowohl die Milzmakrophagen der 64 Vol% Kapselgruppe als auch die Milzen der Tiere nach Infusion von optimierten Kapseln zeigten diese Veränderungen, demnach scheint der Durchmesser der optimierten Albuminkapseln immer noch zu groß, so dass ein Teil

der Kapseln weiterhin durch Makrophagen aufgenommen wurde. Diese Beobachtung geht einher mit den Ergebnissen von Rosenblum et al. [92], die in ihrer Studie beschrieben, dass die Zellen der Milz nach intravenöser Infusion von PFC-Emulsionen in die Maus eine „schaumartige“ Gestalt annahmen. Auch Nanney et al. [93] konnten diese Gestaltsumwandlung in ihrer Studie zeigen, wobei in diesen Untersuchungen PFC-Emulsionen Kaninchen infundiert wurde. Allerdings konnte in den genannten Studien ebenfalls eine Einlagerung des PFCs in die Kupffer-Zellen der Leber beobachtet werden. Diese Beobachtung wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht gemacht. Die Leber zeigte bei der histologischen Beurteilung keine Auffälligkeiten. Dennoch deuten sowohl die histologisch beobachteten Veränderungen der Milz als auch die gemessenen Veränderungen der leberspezifischen Plasmaenzyme darauf hin, dass die beiden Organe primär in die Verarbeitung der Kapseln involviert sind. Milz und Leber sind wesentlicher Bestandteil des Retikuloendothelialen Systems. Dabei handelt es sich um die Gesamtheit aller Zellen (insbesondere Makrophagen), die zur Phagozytose und Speicherung von Partikeln, Fremdstoffen oder Krankheitserregern befähigt sind. Das Retikuloendotheliale System ist damit Bestandteil der zellulären Immunabwehr [20]. Wenn also die Kapseln in die Makrophagen eingelagert werden, wäre dadurch die Kapazität des Retikuloendothelialen Systems reduziert und eine Entfernung von Krankheitserregern minimiert [85]. Bei einem möglichen klinischen Einsatz sollte dieses unbedingt berücksichtigt werden.

Die histologisch beobachteten Veränderungen der Milz können auch den in Abschnitt 5.4.2 erwähnten Anstieg der Aktivität des Plasmaenzyms CK (Abbildung 15 D), nach Infusion von Kapseln, erklären. Der Literatur folgend kann der, in Abschnitt 5.1.2 erläuterte, Filtrationsprozess aktiv beeinflusst werden [94; 95]. Es wird vermutet, dass die interendothelialen Schlitze von sogenannten „Stressfasern“ unterstützt werden [96]. Als Bestandteil dieser Stressfasern konnten Eckert et al. das Plasmaenzym CK nachweisen [97]. Nach den Beobachtungen der Histologie ist somit die Milz als Quelle für den CK-Anstieg denkbar.

5.5 Halbwertszeit

Die zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infusion, im Vollblut gemessene, prozentuale Abnahme der Kapselkonzentration zeigte für die optimierten Kapseln eine Halbwertszeit von 170 Minuten. Damit war die Halbwertszeit im Vergleich zu Kapseln

der Standardsynthese mit einer Konzentration von 32 Vol% (ähnliche Volumenkonzentration wie optimierte Kapseln), die in Wrobeln et al 2017 bestimmt wurde [60] 12 Minuten länger. 158 Minuten nach Infusionsende waren 50% der nicht optimierten Kapseln mit einer Konzentration von 32 Vol% aus der Blutzirkulation entfernt. Am Versuchsende (180 Minuten nach Infusionsende) waren 57,2% der 32 Vol% Kapseln (hergestellt mittels Standardsynthese) und 52,9% der optimierten Kapseln aus dem Gefäßsystem eliminiert. Dies zeigt, dass die Reduktion der Kapselgröße die Halbwertszeit verlängern kann. Keipert et al. haben 1994 in ihrer Arbeit gezeigt, dass die Reduktion der Partikelgröße einer PFC-Emulsion zur Verlängerung der Halbwertszeit führt [98]. Dabei haben die von ihnen verwendeten Partikel mit einem Durchmesser von 50-120 nm, nach intravenöser Infusion in die Ratte, eine Halbwertszeit von acht Stunden gezeigt. Im Vergleich zu den hier untersuchten optimierten Kapseln ist dieser Durchmesser doch deutlich geringer und daher sollten weitere Versuche zur Verringerung des Kapseldurchmessers erfolgen.

Die Halbwertszeit der 64 Vol% Kapseln wurde nicht bestimmt, da bereits die Untersuchung potentiell toxischer Effekte auf schädigende Einflüsse hinwies und damit weitere Untersuchungen unnötig wurden. Im Vergleich zu kapselbasierten Systemen mit anderen Hüllmaterialien zeigen die Albuminkapseln generell bessere Halbwertszeiten. So liegt die Halbwertszeit von PFD gefüllten Polyethylenglycol-Poly(laktid-co-glykolid)-Kapseln (PLGA-Kapseln), in einem identischen Versuchsdesign, lediglich bei 55 Minuten [99]. Die längeren Halbwertszeiten der Albuminkapseln, im Vergleich zu den PLGA-Kapseln, können durch die Albumin-Membran erklärt werden. Pitek et al. konnten zuletzt zeigen, dass die Erkennung der Nanopartikel durch Antikörper bei Anwesenheit von Albumin, im Vergleich zu Polyethylenglycol (PEG), deutlich verringert ist. Denn durch die Konjugation von Albumin an Nanopartikel konnte in ihrer Studie die Halbwertszeit der Partikel unverkennbar erhöht werden, im Vergleich zu Nanopartikeln mit PEG [52]. Auch die Studien von Leclercq et al. deuten darauf hin, dass adsorbiertes Albumin auf Partikeloberflächen zu einer besseren Abschirmung vor dem Immunsystem führt, im Vergleich zu den von ihnen angewandten synthetischen Materialeien [51].

Dabei ist zu erwähnen, dass die Halbwertszeiten von intravasal applizierten Nanokapseln bei der Ratte vermutlich viel kürzer sind als dies im humanen Organismus zu erwarten ist. Denn das Retikuloendotheliale System, welches für die

Aufnahme und Beseitigung von Fremdkörpern verantwortlich ist, hat in der Ratte deutlich höhere Kapazitäten im Vergleich zum Menschen [100]. Daher ist davon auszugehen, dass die intravasale Halbwertszeit beim Menschen deutlich länger ausfallen wird.

5.6 Funktionalität im isoliert perfundierten Organ

Eine wichtige Voraussetzung für den Einsatz eines Blutersatzstoffes ist die Fähigkeit, Sauerstoff in der Lunge aufzunehmen und ihn in den peripheren Geweben wieder zu entlassen [101]. Die *in vitro* Untersuchung der Sauerstofftransportkapazität zeigt eine 1,6-mal höhere Löslichkeit für Sauerstoff bei den 4 Vol% Kapseln im Vergleich zu reinem KH-Puffer (Abbildung 19). Ebenso zeigte die in Wrobeln et al. 2017 [62] abgebildete Messung der wiederholten Gassättigung eindrucksvoll die Möglichkeit, Albuminkapseln wiederholt mit Gasen zu Be- und Entladen, ähnlich wie es unter physiologischen Bedingungen während der Atmung stattfindet. Da Membranen bestehend aus Proteinen eigentlich dafür bekannt sind gasundurchlässig zu sein [102; 103], kann man vermuten, dass die Albuminhülle der hier synthetisierten Kapseln keine dichte Membran aus akkumulierten Albuminmolekülen besitzt, sondern eher eine netzartige, lockere Anordnung der Albuminmoleküle. Damit ist es den Gasmolekülen möglich, diese Barriere zu durchdringen und in dem im Kapselkern befindlichen PFD gelöst zu werden.

Nach den toxischen Untersuchungen und den *in vitro* Versuchen zur Sauerstofftransportkapazität sollte nun eine Untersuchung der Funktionalität der Kapseln in einem etwas physiologischeren Versuchsdesign erfolgen. Dazu wurde die Methode des *in vitro* isoliert perfundierten Organs gewählt. Genauer das Modell des isoliert perfundierten Herzens nach Langendorff, welches bereits in anderen Studien zur Untersuchung von künstlichen Sauerstoffträgern angewandt wurde [104-107]. Die hierzu verwendeten Kapseln zeigten nach Größenbestimmung mittels DLS im Mittel einen hydrodynamischen Durchmesser von 292 nm [62]. Andere Studien mit PFC Emulsionen im isoliert perfundierten Herz verwendeten Suspensionen mit Tröpfchen ähnlicher Größenverteilung [105; 108]. Eine durch die Kapseln ausgelöste Embolisierung der die Mikrozirkulation bildenden Gefäße, wie sie in anderen Studien beobachtet wurde [109], scheint aufgrund der gemessenen geringen Größe eher unwahrscheinlich und konnte aufgrund des fehlenden Druckanstiegs in der Aorta, der

während der Versuche aufgezeichnet wurde (Daten nicht gezeigt), ausgeschlossen werden.

Zunächst musste die optimale Kapselkonzentration für die Versuchsreihen determiniert werden (Abbildung 20). Dazu wurde ein Versuchsdesign zur Erzeugung einer moderaten Ischämie gewählt, welches in Anlehnung an Versuchsverläufe anderer Arbeitsgruppen durchgeführt wurde [110-112]. Initial wurde ein für das Langendorff-Modell üblicher Durchfluss von 10 ml/min gewählt [113], um in der Langendorff Apparatur ein vital schlagendes Herz zu gewährleisten. Nachdem der Durchfluss um 50% reduziert wurde fiel der LVDP und damit die Vitalität des Herzes. Folglich kann man vermuten, dass die im Puffer gelöste Menge an Sauerstoff, bei reduziertem Durchfluss nicht mehr ausreichte, um das Herz in einem vitalen Zustand zu erhalten und so eine moderate Ischämie ausgelöst wurde. Die Perfusion mit 2 Vol% Kapseln konnte den initialen LVDP nicht wiederherstellen. Die Behandlung mit 4 Vol% hingegen konnte trotz Flussverringerung den initialen LVDP sogar überschreiten. Daraus lässt sich Schlussfolgern, dass die Kapseln ausreichend Sauerstoff liefern, so dass das Herz trotz Flussverringerung eine gute Vitalität erreicht. Die Erhöhung der Kapselkonzentration zeigte einen weiteren Anstieg der Vitalität durch die Erhöhung des LVDP. Da diese Erhöhung allerdings über den, in der Langendorff Apparatur, üblichen physiologischen Wert des LVDP hinaus ging wurden die folgenden Versuche mit 4 Vol% Kapseln durchgeführt.

Nachdem die optimale Dosis zur Wiederherstellung der Vitalität, trotz Flussverringerung, ermittelt wurde, sollte die Oxygenierung des Herzens in einem Versuchsdesign zweifach wiederholt werden (Abbildung 21). Dazu wurde das Rate Pressure Product (RPP) als weiterer Parameter zur Beurteilung der Herzvitalität herangezogen. Der initial erreichte RPP in diesem Versuchsdesign, das heißt mit 100% Flussgeschwindigkeit, zeigte ein Niveau ähnlich denen in anderen Studien [114]. Wie auch in der Dosisfindung kam es in diesem Versuch zu einem Abfall des LVDP und RPP nach Flussreduktion und damit zu einer moderaten Ischämie. Erneut konnte in diesem Versuch die Vitalität durch die Perfusion mit 4 Vol% Kapseln wieder hergestellt werden. Auch die zweite Behandlung mit 4 Vol% Kapseln konnte diese Vitalität abermals herstellen. Damit konnte eindrucksvoll gezeigt werden, dass 4 Vol% Kapseln in der Lage sind ausreichend Sauerstoff zu transportieren, um das Herz wiederholt vor einer moderaten Ischämie zu schützen.

Im nächsten Versuch wurde der Fluss schrittweise reduziert, so dass final bei einem Fluss von 20% eine massive Ischämie vorlag (Abbildung 22), wie sie bereits in anderen Studien des isoliert perfundierten Herzens nach massiver Flussreduktion beobachtet werden konnte [110]. Im Vergleich zu den vorherigen Versuchsdesigns wurde das Herz in diesem Versuch bereits von Beginn an mit Kapseln perfundiert, so dass sich die Behandlungsdauer von 10 Minuten (in den vorangegangenen Versuchen) auf 60 Minuten erhöhte. Auch bei dieser längeren Behandlungsdauer mit Kapseln kam es zu keinerlei toxischem Effekt oder Vitalitätseinbußen, im Vergleich zu den Kontrollherzen. Bei der Betrachtung von LVDP und RPP zeigten sich über den gesamten Versuch zum Teil signifikant höhere Werte für die Kapselherzen. Daher kann man von einer besseren Vitalität der Kapselherzen, im Vergleich zu den Kontrollherzen sprechen. Da beide Herzen im Anschluss an die Ischämie nach Herstellung der Ausgangsflussrate von 100%, wieder den initialen LVDP (Kontrollherzen) bzw. höhere LVDP Werte als den initialen Wert (Kapselherzen) zeigten, ist davon auszugehen, dass die 40-minütige Periode der Ischämie keinen permanenten Schaden zur Folge hatte. Das liegt möglicherweise in der Präsenz freier Albuminmoleküle im KH-Puffer begründet, denn im Vergleich zu dem sonst üblicherweise in der Langendorff Perfusion angewandten KH-Puffer [113; 115-117] wurde dem modifizierten KH-Puffer zusätzlich bovines Serum Albumin zugesetzt. Zum einen, da Dunkelfeldaufnahmen und Stabilitätsuntersuchungen gezeigt haben, dass die Albuminkapseln in elektrolythaltigem Medium ohne Zusatz von Albumin nicht stabil sind [60] und zum anderen da die Anwesenheit von freiem Albumin die Langlebigkeit von Perfluorocarbon-perfundierten Herzen erhöht [118]. Außerdem scheinen die Herzen von dem durch das Albumin erzeugten onkotisch wirksamen Druck zu profitieren [113]. Andere Studien am isoliert perfundierten Herz nach Langendorff zeigten, dass Herzen, perfundiert mit Perfluorocarbonen, im Vergleich zu Herzen perfundiert mit KH-Puffer, weniger Zellschäden zeigen, da signifikant geringere Laktatlevel gemessen werden konnten [119]. Eventuell ist dies auch der Grund für die im Rahmen dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse. Die Kapselherzen zeigten während des gesamten Versuchs und auch final nach der massiven Ischämie bei Wiederherstellung des initialen Flusses eine bessere Vitalität, möglicherweise aufgrund einer geringeren Zellschädigung.

Neben der reinen Untersuchung der Funktionalität wird nach den Versuchen des isoliert perfundierten Herzens deutlich, dass auch ein therapeutischer Einsatz der

Kapseln in diesem Bereich denkbar wäre. So haben andere, mehr klinisch orientierte Studien den Einsatz von PFC Emulsionen als Therapeutika untersucht. Dabei wurde, unter anderem, der Einsatz von PFC Emulsionen bei der Verwendung von Herz-Lungen-Maschinen genauer erforscht [104; 106; 120; 121]. Aufgrund der hier gezeigten vielversprechenden Ergebnisse wäre ein therapeutischer Einsatz der Kapseln in dieser Art der Anwendung ebenfalls denkbar.

5.7 Hämodilution

Nachdem die Funktionalität der Albuminkapseln mehrfach *in vitro* gezeigt werden konnte, sollte nun der Funktionsbeweis im Gesamtorganismus erfolgen. Aufgrund der Ergebnisse der Untersuchung potentiell toxischer Effekte (Abschnitt 4.4) wurde die Kapselsuspension für den Versuch der Hämodilution angepasst. Dabei wurde zunächst die Volumenkonzentration auf 12 Vol% eingestellt um final eine ähnliche Volumenkonzentration wie im vorangegangenen Topload-Modell zu infundieren. Bei der Untersuchung potentiell toxischer Effekte (Abschnitt 4.4) wurde etwa 1/6 des Blutvolumens der Ratte in Form von Kapseln infundiert. Im Fall der 64 Vol% Kapseln betrug die tatsächliche Volumenkonzentration der Kapseln im Blut der Ratte also etwa 11 Vol%. Da im Versuch der Hämodilution beinahe das gesamte Blut der Ratte (finaler Hämatokrit 5%) gegen Kapseln ausgetauscht wurde entsprach die finale Volumenkonzentration der Kapseln in etwa der tatsächlich im Blut vorhandenen Volumenkonzentration von 64 Vol% Kapseln im Versuch potentiell toxischer Effekte.

Um einer Hypoglykämie, wie im Versuch potentiell toxischer Effekte bei den Kapseltieren beobachtet (Abbildung 14 F), entgegenzuwirken, wurde den Infusionslösungen (Kontrolle und Kapseln) 10 mM Glukose zugesetzt. Diese Konzentration entspricht der physiologisch vorhandenen Plasmaglukose der hier untersuchten Wistar-Ratten [122].

Der kritische Hämatokrit ist der Wert bei dessen Unterschreiten ein unzureichendes Sauerstoffangebot vorliegt und es deshalb zu einer Gewebhypoxie kommt [123]. Die verschiedenen Organsysteme besitzen individuell kritische Hämatokritgrenzen. Bei der Ratte liegt der kritische Hämatokrit, bei dem man davon ausgehen kann, dass alle Organe unterversorgt werden, bei etwa 10%. In dem hier angewandten Modell wurde dieser Wert deutlich unterschritten, so dass final ein Hämatokrit von 5% vorlag. Dies erfolgte, um die Folgen einer Hypoxie bei den Kontrolltieren deutlich sichtbar zu

machen. Im Vergleich dazu, konnte bei den Kapseltieren die Fähigkeit der Kapseln, Gewebe mit ausreichend Sauerstoff zu versorgen, durch die Effekte der massiven Hämodilution untersucht werden. Ähnliche Vorgehensweisen wurden auch von anderen Gruppen zur Untersuchung der Funktionalität von Sauerstoffträgern angewandt [124-126]. Die durchgeführten Aufzeichnungen des aktuellen Hämatokrits verdeutlichen, dass die Dilution in den Versuchsgruppen einheitlich und reproduzierbar ausgeführt werden konnte (Abbildung 6).

Generell hat der Versuch der Hämodilution gezeigt, dass eine normovoläme Dilution mit 12 Vol% Kapseln zu einem längeren Überleben von Ratten führte (Abbildung 23). Der MAP der Kapseltiere fiel zeitweise signifikant, im Vergleich zur Kontrollgruppe, konnte aber insbesondere nach der Dilution in den Kapseltieren stabilisiert werden (Abbildung 24 A). Diese Stabilisierung konnte in den Kontrolltieren nicht erreicht werden, was in einer final geringeren Überlebenszeit resultierte. Überraschenderweise zeigten sowohl Herzfrequenz (Abbildung 24 B) als auch Atmung (Abbildung 24 C) keine signifikanten Differenzen zwischen den beiden Gruppen. Obwohl die Tiere der Kontrollgruppe eine Hypoxie erlitten haben, wie der gemessene pO_2 verdeutlicht (Abbildung 25 B), zeigten sie keine (erwartete) Anpassung der Atmung und Herzfrequenz um das Sauerstoffdefizit auszugleichen.

Interessanterweise konnten die Tiere der Kapselgruppe ihre Körperkerntemperatur nach der Dilution stabil aufrechterhalten, wohingegen die Tiere der Kontrollgruppe eine signifikante Abnahme der Körperkerntemperatur zeigten (Abbildung 24 D). Gellhorn konnte im Jahr 1937 zeigen, dass die Körpertemperatur bei einem Sauerstoffdefizit reduziert ist [127]. Er postuliert in seiner Arbeit, dass der Sauerstoffmangel mit einem CO_2 Anstieg einhergeht. Das CO_2 führt, als vasodilatorisch wirksames Molekül, zu einer Dilatation der blutführenden Gefäße. Diese Dilatation führt schlussendlich dazu, dass es zu einem Temperaturverlust über die Körperoberfläche kommt. Analog zu Gellhorns Thesen zeigen die Tiere der Kontrollgruppe im Versuch der Hämodilution einen geringeren pO_2 (Abbildung 25 B) und höheren pCO_2 (Abbildung 25 C), im Vergleich zu den Tieren der Kapselgruppe. Vermutlich ist der Temperaturverlust der Kontrolltiere also, wie durch Gellhorn beschrieben, auf das Sauerstoff-Defizit und den Anstieg des pCO_2 zurück zu führen. Die Kapseltiere zeigten einen höheren pO_2 und geringeren pCO_2 und konnten daher vermutlich ihre Körpertemperatur konstant halten.

Wie bereits bei der Untersuchung potentiell toxischer Effekte beobachtet, zeigen auch in dem Versuch der Hämodilution die Kapseltiere einen tendenziell stabileren pH-Wert (Abbildung 25 A). Auch hier kann also auf einen positiven Einfluss der Kapseln auf den Säure-Base Haushalt geschlossen werden.

Analog zu den Ergebnissen der toxischen Untersuchungen konnte auch in diesem Versuch in den Tieren der Kapselgruppe eine Reduktion der Glukose beobachtet werden (Abbildung 25 D). Trotz der Substitution von 10 mM Glukose in der Dilutionslösung konnte die Hypoglykämie nicht verhindert werden, so dass es wie bereits in Abschnitt 5.4.2 diskutiert vermutlich zu einem Ausbleiben von Glykogenolyse oder Glukoneogenese gekommen sein kann. Da das Plasmaenzym ALAT nach der Dilution ein ähnliches Niveau erreichte wie in der Untersuchung potentiell toxischer Effekte (Abbildung 26 A), kann auch hier von einer transienten Leberbeeinträchtigung ausgegangen werden mit den bereits oben genannten Folgen.

Interessanterweise zeigen die Tiere der Kontrollgruppe zunächst eine Hyperglykämie, bevor auch hier eine Reduktion der Plasmaglukose einsetzt. Vermutlich ist diese Hyperglykämie auf einen Sauerstoff-Defizit bedingten Schock zurück zu führen, wie er auch in anderen Studien, im Zusammenhang mit hämorrhagischem Schock, beobachtet werden konnte [128]. Auch der massive Anstieg der plasmatischen Laktatkonzentration der Kontrolltiere im Anschluss an die Dilutionsphase (Abbildung 25 E) deutet auf eine Hypoxie hin.

Die gemessenen Organschädigungsparameter (Abbildung 26) zeigen nach Dilution mit 12 Vol% Kapseln im Versuch der Hämodilution final analoge Niveaus wie nach Infusion von 64 Vol% Kapseln in der Untersuchung potentiell toxischer Effekte. Daher kann, entsprechend den Organschäden der toxischen Untersuchung, auch hier von einer strukturellen Veränderung der Milz ausgegangen werden. Da die Tiere aufgrund des Versuchsdesigns zu unterschiedlichen Zeitpunkten verstarben konnte eine histopathologische Beurteilung der Organe, aufgrund von mangelnder Vergleichbarkeit, nicht erfolgen.

Die in der Hämodilution beobachteten Organveränderungen korrelieren mit den Beobachtungen der Untersuchung toxischer Effekte (Abschnitt 4.4). Dies ist auf die verwendeten, beinahe identischen Kapselkonzentrationen zurück zu führen. Generell konnten sowohl die *in vitro* (Abschnitt 4.1, 4.2, 4.3, 4.7.) als auch die *in vivo*

(Abschnitt 4.4, 4.7) durchgeführten Versuche dieser Arbeit das therapeutische Potential der Perfluorodecalin gefüllten Albuminkapseln erfolgreich demonstrieren. Dennoch besteht bis zur finalen Form weiterer Optimierungsbedarf, um das bis dato vorhandene Nebenwirkungsprofil auf diese Weise zu minimieren.

6 Ausblick

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit ist es gelungen, weiterführende *in vitro* Charakterisierungen von Perfluorodecalin gefüllten Albuminkapseln als künstliche Sauerstoffträger sowie erstmalig Untersuchungen zu deren Funktionalität im isolierten Organ und im Rattenmodell der Hämodilution durchzuführen. Dabei konnte deren allgemeine Verträglichkeit sowie Funktionalität eindrucksvoll bestätigt werden, wenngleich noch leichte toxische Effekte auftraten. Diese heißt es in weiteren Arbeiten zu eliminieren.

Um die Nebenwirkungen weiter zu reduzieren, sollten zukünftige Präparate weiter modifiziert werden, ohne dabei von der hier untersuchten Basis (Kern: PFC, Hüllmaterial: HSA) abzuweichen. Da es vermutlich zur Einlagerung in die Milz gekommen ist (Abschnitt 5.4.3), sollte die weitere Reduktion der Kapselgröße dabei im Fokus stehen. Neben der Verringerung des Nebenwirkungsprofils könnte so auch die Halbwertszeit weiter verlängert werden. Zudem ist bekannt, dass die Sauerstoffkapazität positiv durch einen geringeren Kapseldurchmesser beeinflusst werden kann [98].

In Zukunft wäre, mit kleineren Kapseln, auch der Einsatz von geringeren Kapselkonzentrationen aber gleicher Sauerstoffkapazität denkbar, um das Nebenwirkungsprofil zu minimieren. Zur Reduktion der Kapselkonzentration und bei gleichzeitigem Erhalt klinisch relevanter Sauerstofftransportkapazitäten müssten andere PFCs als PFD verwendet werden. Bekannt ist, dass die Sauerstofflöslichkeit der PFCs mit abnehmendem Molekulargewicht steigt und lineare PFCs generell eine bessere Sauerstofflöslichkeit zeigen als polyzyklische [2]. Als medizinisch zugelassenes PFC mit niedrigen Organretentionszeiten stünde hier Perfluoroclybromid (PFOB) zur Diskussion. *In vitro* Studien zur Sauerstoffkapazität von PFOB-Albuminkapseln müssten die höhere Sauerstoffkapazität, im Vergleich zu PFD-Albuminkapseln bestätigen, bevor dann *in vivo* Untersuchungen zur Toxizität erfolgen.

Zudem sollte eine genauere Untersuchung der katabolen Stoffwechselwege im Hinblick auf Glukokortikoide erfolgen, um die im Rahmen dieser Arbeit beobachtete Hypoglykämie genauer zu verstehen und schlussendlich Ansätze zu deren Vermeidung entwickeln zu können. Dabei sollte detailliert auf die Interaktion der

Glukokortikoide mit den Albuminmolekülen der Kapselhülle sowie auf die Interaktion mit Albuminmolekülen der Trägerlösung geblickt werden.

Auch die Untersuchung der Sauerstoffradikalbildung bzw. der Beseitigung von Sauerstoffradikalen sollte in weiteren Forschungen ins Auge gefasst werden. Dabei könnte die Bestimmung des Radikalfängers Gluthation [129] und die Untersuchung der Peroxisomen Aufschluss über mögliche toxische Effekte der Sauerstoffträger liefern. Interessant wäre in diesem Zusammenhang auch die direkte Wirkung der Albuminkapseln auf Mitochondrien und den daraus resultierenden Effekt z. B. in einem *in vitro* Versuch isolierter Mitochondrien. In einem derartigen Versuch sollte man insbesondere die Funktionalität des Malat-Aspartat-Shuttles genauer untersuchen, um festzustellen ob eine Überladung des Shuttles stattfindet.

Zukünftige Rattenmodelle, die eine Narkoseführung benötigen, sollten bezüglich der Wahl des Narkosemittels überdacht werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten zeigen, dass der Einsatz von Isofluran, bei der Untersuchung von PFC haltigen Präparaten, unter Umständen beeinträchtigt sein kann.

Nach den im Rahmen dieser Arbeit entstandenen akuten toxischen Profilen sollten in Zukunft auch Langzeitstudien zur Toxizität der Albuminkapseln erfolgen. Dabei sollten insbesondere die Organe Leber und Milz ins Auge gefasst werden, um zu klären, ob es sich nur um transiente Beeinträchtigungen oder doch um irreversible Schädigungen handelt.

7 Zusammenfassung

In den letzten Jahrzehnten wurde intensiv an der Entwicklung von Blutersatzstoffen als artifizielle Sauerstoffträger geforscht. Dabei soll der Sauerstoffträger sowohl für die routinemäßige Versorgung des Patienten als auch zur präklinischen Notfallversorgung verwendet werden. Der Bedarf ist aufgrund des demographischen Wandels und der parallel dazu abnehmenden Spendenbereitschaft enorm. Trotz der intensiven Forschung hat es bis heute kein Produkt in die klinische Anwendung Europas und den USA geschafft. Dabei sind neben dem Transport von essentiellen Atemgasen viele weitere Herausforderungen an die Entwicklung gestellt.

Diese Arbeit ist Bestandteil der überaus komplexen Entwicklung, indem Perfluorodecalin gefüllte Albuminkapseln als artifizielle Sauerstoffträger sowohl *in vitro* weiter charakterisiert als auch deren potentiell toxische Effekte im Modell der Ratte untersucht wurden. Darüber hinaus wurde die Funktionalität im isoliert perfundierten Organ sowie im Hämodilutionsmodell der Ratte experimentell erforscht.

Die *in vitro* Charakterisierung zeigte, dass die Kapseln in Albumin-haltigem Medium ihre Größe bis zu sieben Tage stabil halten können. Dabei wurde bei der Synthese auf die Verwendung von potentiell toxischen Stabilisatoren, wie sie bei anderen Sauerstoffträgern üblicherweise verwendet werden, verzichtet.

Die Untersuchung potentiell toxischer Effekte verschiedener Kapselgenerationen zeigte nach intravenöser Verabreichung im Modell der Ratte eine gute Bioverträglichkeit der untersuchten Albuminkapseln. Dies wurde verdeutlicht durch das Überleben aller untersuchten Tiere und stabile systemische Parameter während des gesamten Versuchs. Allerdings manifestierten sich anhand von gemessenen Schädigungsparametern Beeinträchtigungen der Leber sowie, ermittelt durch histologische Beurteilungen, strukturelle Veränderungen der Milz. Darüber hinaus konnte nach Infusion der Albuminkapseln eine Hypoglykämie beobachtet werden.

Die Verringerung des mittleren Kapseldurchmessers von vormals 1028 nm auf 252 nm führte zu einer Verlängerung der intravasalen Halbwertszeit auf 170 Minuten. Verglichen zu den Kapseln der ersten Generation, die eine Halbwertszeit von 158 Minuten besaßen konnte die Halbwertszeit somit um 12 Minuten gesteigert werden.

Die Anwendung der Albuminkapseln im isoliert perfundierten Herzen nach Langendorff zeigte eindrucksvoll deren Eigenschaft, Sauerstoff in Gewebe zu transportieren und dort abzugeben. In dem Versuch wurden Herzen mehrfach unter hypoxische Bedingungen gebracht, um sie dann erfolgreich mit Perfluorodecalin gefüllten Albuminkapseln zu Re-Oxygenieren.

Nach dem erfolgreichen Versuch am isoliert perfundierten Organ folgte abschließend die Überprüfung der Funktionalität im Gesamtorganismus. Dabei wurden Ratten, durch den Austausch des Blutes gegen Albuminkapseln, massiv diluiert. Im Gegensatz zu den Kontrolltieren überlebten die Tiere mit Hilfe der Kapseln unter normalerweise nicht mehr mit dem Leben vereinbaren Hämatokritwerten.

Zusammenfassend stellen die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Perfluorodecalin gefüllten Albuminkapseln ein vielversprechendes Produkt dar, das insgesamt als therapeutisch relevant eingestuft werden kann. Dennoch sollten weitere Optimierungen der Albuminkapseln erfolgen, um das aktuell bestehende Nebenwirkungsprofil weiter zu minimieren sowie die intravasale Halbwertszeit nochmals zu verlängern.

8 Literatur

1. **Chang TMS.** Future generations of red blood cell substitutes. *Journal of internal medicine.* 2003, 253:527-535.
2. **Riess JG.** Oxygen carriers ("blood substitutes")--raison d`etre, chemistry, and some physiology. *Chemical Reviews.* 2001, 101:2797-920.
3. **Weiskopf RB.** Hemoglobin-based oxygen carriers: compassionate use and compassionate clinical trials. *Anesthesia & Analgesia.* 2010, 110:659-662.
4. **Simoni J.** New approaches in commercial development of artificial oxygen carriers. *Artificial Organs.* 2014, 38:621-624.
5. **Wang D, Sun J, Solomon SB, Klein HG, Natanson C.** Transfusion of older stored blood and risk of death: a meta-analysis. *Transfusion.* 2012, 52:1184-1195.
6. **Castro CI, Briceno JC.** Perfluorocarbon-Based Oxygen Carriers: Review of Products and Trials. *Artificial Organs.* 2010, 34:622-634.
7. **Lowe KC.** Engineering blood: synthetic substitutes from fluorinated compounds. *Tissue Engenring.* 2003, 9:389-399.
8. **Sloviter HA, Kamimoto T.** Erythrocyte Substitute for Perfusion of Brain. *Nature.* 1967, 216:458-460.
9. **Spiess BD.** Perfluorocarbon emulsions as an promising technology: a review of tissue and vascular gas dynamics. *Journal of Applied Physiology.* 2009, 106:1444-1452.
10. **Clark LC, Gollan F.** Survival of mammals breathing organic liquids equilibrated with oxygen at atmospheric pressure. *Science.* 1966, 152:1755-1756.
11. **Keipert PE.** Oxygen therapeutics ("blood substitutes") where are they, and what can we expect? *Advances in Experimental Medicine and Biology.* 2003, 540:207-213.
12. **Flaim SF.** Pharmacokinetics and Side Effects of Perfluorocarbon-Based Blood Substitutes. *Artificial cells, blood substitutes, and immobilization biotechnology .* 1994, 22:1043-1054.

13. **Clark MC, Weiman DS, Pate JW, Gir S.** Perfluorocarbons: future clinical possibilities. *Journal of Investigative Surgery*. 1997, 10:357-365.
14. **Ferenz KB, Waack IN, Laudien J, Mayer C, Broecker-Preuss M, de Groot H, Kirsch M.** Safety of Poly (ethylene glycol)-coated Perfluorodecalin-filled Poly (lactide-co-glycolide) microcapsules following intravenous administration of high amounts in rats. *Results in Pharma Sciences*. 2014, 4:8-18.
15. **Laudien J, Groß-Heitfeld C, Mayer C, de Groot H, Kirsch M, Ferenz KB.** Perfluorodecalin-Filled Poly(n-butyl-cyanoacrylate) Nanocapsules as Potential Artificial Oxygen Carriers: Preclinical Safety and Biocompatibility. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2014, 15:1-12.
16. **Stephan C, Schlawne C, Grass S, Waack IN, Ferenz KB, Bachmann M, Barnert S, Schubert R, Bastmeyer M, de Groot H, Mayer C.** Artificial oxygen carriers based on perfluorodecalin-filled poly(n-butyl-cyanoacrylate) nanocapsules. *Journal of Microencapsulation*. 2014, 31:284-292.
17. **Mattrey RF, Hilpert PL, Long CD, Long DM, Mitten RM, Peterson T.** Hemodynamic effects of intravenous lecithin-based perfluorocarbon emulsions in dogs. *Critical Care Medicine* . 1989, 17:652-656.
18. **Ingram DA, Forman MB, Murray JJ.** Activation of complement by Fluosol Attributable to the Pluronic Detergent Micelle Structure. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 1993, 22:456-461.
19. **Vercellotti GM, Hammerschmidt DE, Craddock PR, Jacob HS.** Activation of Plasma Complement by Perfluorocarbon Artificial blood: Probable Mechanism of Adverse Pulmonary Reactions in treated Patients and rationale for Corticosteroid Prophylaxis. *Blood*. 1982, 59:1299-1304.
20. **Lüllmann-Rauch R.** *Taschenlehrbuch Histologie 2. Auflage*. Stuttgart : Thieme, 2006. ISBN 9783131292421.
21. **Blundell J.** Some account of a case of obstinate vomiting, in which an attempt was made to prolong. *Medico-Chirurgical Transactions*. 1819, 10:296–331.
22. **Hourfar MK, Jork C, Schottstedt V, Weber-Schehl M, Brixner V.** Experience of German Red Cross blood donor services with nucleic acid testing: results of screening

more than 30 million blood donations for human immunodeficiency virus-1, hepatitis C virus, and hepatitis B virus. *Transfusion*. 2008, 48:1558-1566.

23. **Barker LF, Gerety RJ.** The clinical problem of hepatitis transmission. *Progress in Clinical and Biological Research* . 1976, 11:163-182 .

24. **Gombotz H, Zacharowski K, Spahn DR.** *Patient Blood Management*. Stuttgart : Thieme Verlag KG, 2013. ISBN 9783131706218 .

25. **Ferenz KB.** Künstliche Sauerstoffträger - Wie lange müssen wir noch warten? *Hämotherapie* . 2015, 25:27-36 .

26. **Habler O, Pape A, Meier J, Zwissler B.** Artificial oxygen carriers as an alternative to red blood cell transfusion. *Anaesthesist*. 2005, 54:741-754.

27. **Lowe KC.** Blood substitutes: From chemistry to clinic. *Journal of Materials Chemistry*. 2006, 16:4189-4196.

28. **Schöler M, Frietsch T, Jambor C, Knels R.** Artificial blood-coming soon or never reaching clinical maturity? *Deutsche Medizinische Wochenschrift*. 2010, 135:575-581.

29. **Winslow RM.** Current status of oxygen carriers (‘blood substitutes’). *Vox Sanguinis*. 2006, 91:102-110.

30. **Chen JY, Scerbo M, Kramer G.** A review of blood substitutes: examining the history, clinical trial results, and ethics of hemoglobin-based oxygen carriers. *Clinics*. 2009, 64: 803-813.

31. **Natanson C, Kern SJ, Lurie P, Banks SM, Wolfe SM.** Cell-free hemoglobin-based blood substitutes and risk of myocardial infarction and death: a meta-analysis. *The Journal of the American Medical Association*. 2008, 299:2304-2312.

32. **Simoni J.** Artificial oxygen carriers: scientific and biotechnological points of view. *The International Journal of Artificial Organs*. 2009, 33:92-96.

33. **Epperla N, Strouse C, VanSandt AM, Foy P.** Difficult to swallow: warm autoimmune hemolytic anemia in a Jehovah's Witness treated with hemoglobin concentrate complicated by achalasia. *Transfusion*. 2016, 56:1801-1806.

-
34. **Scurtu VF, Mot AC, Silaghi-Dumitrescu R.** Protein-based blood substitutes: recent attempts at controlling pro-oxidant reactivity with and beyond hemoglobin. *Pharmaceuticals*. 2013, 6:867-880.
35. **Lui FE, Kluger R.** Reviving artificial blood: meeting the challenge of dealing with NO scavenging by hemoglobin. *ChemBioChem*. 2010, 11:1816-1824.
36. **Centis V, Vermette P.** Enhancing oxygen solubility using hemoglobin- and perfluorocarbon-based carriers. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)* . 2009, 14:665-688.
37. **Yokoyama K.** Effect of perfluorochemical (PFC) emulsion on acute carbon monoxide poisoning in rats. *The Japanese Journal of Surgery*. 1978, 8:342-352.
38. **Riess JG.** Understanding the fundamentals of perfluorocarbons and perfluorocarbon emulsions relevant to In vivo oxygen delivery. *Artificial Cells Blood Substitutes and Biotechnology*. 2005, 33:47-63.
39. **Krafft MP.** Fluorocarbons and fluorinated amphiphiles in drug delivery and biomedical research. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2001, 47: 209-228.
40. **Riess JG.** Reassessment of criteria for the selection of perfluorochemicals for 2nd generation blood substitutes-analysis of structure property relationships. *The International Journal of Artificial Organs*. 1984, 8:44-56.
41. **Peters T.** *All about Albumin*. New York : Academic Press, 1996. ISBN 9780125521109.
42. **Patil GV.** Biopolymer Albumin for Diagnosis and in Drug Delivery. *Drug Development Research*. 2003, 58:219-247.
43. **Caironi P, Gattinoni L.** The clinical use of albumin: the point of view of a specialist in intensive care. *Blood Transfusion*. 2009, 7:259–267 .
44. **Quinlan GJ, Martin GS.** Albumin: biochemical properties and therapeutic potential. *Hepatology*. 2005, 41:1211-1219.
45. **Elzoghby AO, Samy WM, Elgindy NA.** Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*. 2012, 157:168-182.

46. **Damascelli B, Patelli GL, Lanocita R, Di Tolla G, Frigerio LF, Marchianò A, Garbagnati F, Spreafico C, Tichà V, Gladin CR, Palazzi M, Crippa F, Oldini C, Calò S, Bonaccorsi A, Mattavelli F, Costa L, Mariani L, Cantù G.** A novel intraarterial chemotherapy using paclitaxel in albumin nanoparticles to treat advanced squamous cell carcinoma of the tongue: preliminary findings. *American Journal of Roentgenology*. 2003, 181:253-260.
47. **Kramer PA.** Albumin Microspheres as Vehicles for Achieving Specificity in Drug Delivery. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1974, 63:1646-1647.
48. **Brannon-Peppas L.** Recent advances on the use of biodegradable microparticles and nanoparticles in controlled drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. 1995, 116:1-9.
49. **Li FQ, Hu JH, Lu B, Yao H, Zhang WG.** Ciprofloxacin-loaded bovine serum albumin microspheres: preparation and drug-release in vitro. *Journal of Microencapsulation*. 2001, 18:825-829.
50. **Neuberger T, Schöpf B, Hofmann H, Hofmann M, von Rechenberg B.** Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications: Possibilities and limitations of a new drug delivery system. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 2005, 293:483-496.
51. **Leclercq L, Vert M.** Comparison between protein repulsions by diblock PLA-PEO and albumin nanocoatings using OWLS. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 2016, 28:177-193.
52. **Pitek AS, Jameson SA, Veliz FA, Shukla S, Steinmetz F.** Serum Albumin “Camouflage” of Plant Virus Based Nanoparticles Prevents Their Antibody Recognition and Enhances Pharmacokinetics. *Biomaterials*. 2016, 89:89–97.
53. **Haruki R, Kimura T, Iwasaki H, Yamada K, Kamiyama I, Kohno M, Taguchi K, Nagao S, Marayuma T, Otagiri M, Komatsu T.** Safety Evaluation of Hemoglobin-Albumin Cluster“HemoAct” as a Red Blood Cell Substitute. *Scientific Reports*. 2015, 5:12778.

-
54. **Tsuchida E, Sou K, Nakagawa A, Sakai H, Komatsu T, Kobayashi K.** Artificial Oxygen Carriers, Hemoglobin Vesicles and Albumin–Hemes, Based on Bioconjugate Chemistry. *Bioconjugate Chemistry*. 2009, 20:1419–1440.
55. **Xiong Y, Liu ZZ, Georgieva R, Smuda K, Steffen A, Sendeski M, Voigt A, Patzak A, Bäuml H.** Nonvasoconstrictive hemoglobin particles as oxygen carriers. *ACS Nano*. 2013, 7:7454–7461.
56. **Clark LC Jr, Kaplan S, Becattini F, Benzing G.** Perfusion of whole animals with perfluorinated liquid emulsions using the Clark bubble-defoam heart-lung machine. *Federation proceedings*. 1970, 29:1764-1770.
57. **Chen Z, He Y, Shi B, Yang D.** Human serum albumin from recombinant DNA technology: Challenges and strategies. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2013, 1830:5515-5525. .
58. **Webb AG, Wong M, Kolbeck R, Magin R, Suslick KS.** Sonochemically produced perfluorocarbon microspheres: a new class of magnetic resonance imaging agent. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*. 1996, 6:675-683.
59. **Wrobeln A.** Synthese und Charakterisierung von Perfluorodecalin gefüllten Albuminkapseln als Sauerstoffträger. *Masterthesis*. 2013.
60. **Wrobeln A, Laudien J, Groß-Heitfeld C, Linders J, Mayer C, Wilde B, Knoll T, Naglav D, Kirsch M, Ferenz KB.** Albumin-derived perfluorocarbon-based artificial oxygen carriers: A physico-chemical characterization and first in vivo evaluation of biocompatibility. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2017, 115:52–64.
61. **Brookes ZL, Kaufmann S.** Effects of atrial natriuretic peptide on the extrasplenic microvasculature and lymphatics in the rat in vivo. *The Journal of Physiology*. 2005, 565:269.277.
62. **Wrobeln A, Schlüter KD, Linders J, Zähres M, Mayer C, Kirsch M, Ferenz KB.** Functionality of albumin-derived perfluorocarbon-based artificial oxygen carriers in the Langendorff-heart. *Artificial cells, Nanomedicine and Biotechnology*. 2017, 45:723-730.

-
63. **Krug M.** krug-markus.de. <http://www.krug-markus.de/beruf/fachwissen/das-herz/>. [Online] November 2015.
64. **Döring HJ, Dehnert H, Tigerstedt R.** *Das isolierte perfundierte Warmblüter-Herz nach Langendorff*. s.l. : Biomesstechnik-Verlag, 1985. ISBN 978-3-924638-04-7.
65. **Gao S, Lewis GD, Ashokkumar M, Hemar Y.** Inactivation of microorganisms by low-frequency high-power ultrasound: 1. Effect of growth phase and capsule properties of the bacteria. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2014, 21:446–453.
66. **Drakopoulou S, Terzakis S, Fountoulakis MS, Mantzavinos D, Manios T.** Ultrasound-induced inactivation of gram-negative and gram-positive bacteria in secondary treated municipal wastewater. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2009, 16:629-634.
67. **Deplaine G, Safeukui I, Jeddi F, Lacoste F, Brousse V, Perrot S, Biligui S, Guillotte M, Guitton C, Dokmak S, Aussilhou B, Sauvanet A, Cazals Hatem D, Paye F, Thellier M, Mazier D, Milon G, Moha N, Mercereau-Puijalon O, David PH, Buffet PA.** The sensing of poorly deformable red blood cells by the human spleen can be mimicked in vitro. *Blood*. 2011, 117:e88-e95.
68. **Demoy M, Gibaud S, Andreux JP, Weingarten C, Gouritin B, Couvreur P.** Splenic Trapping of Nanoparticles: Complementary Approaches for In Situ Studies. *Pharmaceutical Research*. 1997, 14:463–468.
69. **Demoy M, Andreux JP, Weingarten C, Gouritin B, Guilloux V, Couvreur P.** Spleen Capture of Nanoparticles: Influence of Animal Species and Surface Characteristics. *Pharmaceutical Research*. 1999, 16:37–41.
70. **Arshady, R.** Albumin microspheres and microcapsules: Methodology of manufacturing techniques. *Journal of Controlled Release*. 1990, 14:111-131.
71. **Han Y, Radziuk D, Shchukin D, Moehwald H.** Stability and size dependence of protein microspheres prepared by ultrasonication. *Journal of materials chemistry*. 2008, 18:5162-5166.
72. **Lochmann D, Weyermann J, Georgens C, Prassi R, Zimmer A.** Albuminprotamine-oligonucleotide nanoparticles as a new antisense delivery system.

Part 1: physicochemical characterization. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2005, 59:419-429.

73. **Patton JN, Palmer AF.** Physical properties of hemoglobin-poly(acrylamide) hydrogel-based oxygen carriers: effect of reaction pH. *Langmuir*. 2006, 22:2212-2221.

74. **Roser M, Fischer D, Kissel T.** Surface-modified biodegradable albumin nano-and microspheres. II: effect of surface charge on in vitro phagocytosis and biodistribution in rats. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 1998, 46:255-263.

75. **Tremper KK, Friedman AE, Levine EM, Lapin R, Camarillo D.** The Preoperative Treatment of Severely Anemic Patients with a Perfluorochemical Oxygen-Transport Fluid, Fluosol-DA. *The New England Journal of Medicine* . 1982, 307:277-283.

76. **Waxman K, Cheung CK, Mason GR.** Hypotensive reaction after infusion of a perfluorochemical emulsion. *Critical Care Medicine*. 1984, 12:609-610.

77. **Faithfull NS, King CE, Cain SM.** Peripheral vascular responses to fluorocarbon administration. *Microvascular Research*. 1987, 33:183-193.

78. **Cabrales P, salazar Vasquez BY, Chavez Negrete A, Intagliette M.** Perfluorocarbons as gas transporters for O₂, NO, CO and volatile anesthetics. *Transfusion Alternatives in Transfusion Medicine*. 2007, 9:294-303.

79. **Phypers B, Pierce JMT.** Lactate physiology in health and disease. *Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain*. 2006, 6:128-132.

80. **Laudien J.** Biologische Verträglichkeit künstlicher Sauerstoffträger auf Perfluorcarbon-Basis. *Dissertation*. 2014.

81. **Bentley PK, Johnson OL, Washington C, Lowe KC.** Uptake of concentrated perfluorocarbon emulsions into rat lymphoid tissues. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 1993, 45:182-185.

82. **Bollands AD, Lowe KC.** Effects of a perfluorocarbon emulsion, fluosol-DA, on rat lymphoid tissue and immunological competence. *Comparative Biochemistry and Physiology* . 1986, 2:309-312.

-
83. **Bruneton JN, Falewee MN, Francois E, Cambon P, Philip C, Riess JG, Balu-Maestro C, Rogopoulos A.** Liver, spleen, and vessels: preliminary clinical results of CT with perfluorooctylbromide. *Radiology*. 1989, 170:179-183.
84. **Caiazza S, Fanizza C, Ferrari M.** Fluosol 43 particle localization pattern in target organs of rats. *Virchows Archiv*. 1984, 404:127-137.
85. **Lutz J, Metzenauer P.** Effects of potential blood substitutes (perfluorochemicals) on rat liver and spleen. *European Journal of Physiology*. 1980, 387:175-181.
86. **Fasano M, Curry S, Terreno E, Galliano M, Fanali G, Narciso P, Notari S, Ascenzi P.** The extraordinary ligand binding properties of human serum albumin. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Journals*. 2005, 57:787–796.
87. **Jägers J.** Zur Erforschung der Auswirkungen eines Blutersatzstoffes im Modell der isoliert perfundierten Niere. *Bachelorthesis*. 2017.
88. **O'Donnell JM, Nacul FE.** *Surgical Intensive Care Medicine*. s.l. : Springer, 2016. ISBN 9783319196688.
89. **Deneke SM, Fanburg BL.** Normobaric oxygen toxicity of the lung. *The new england journal of medicine*. 1980, 303:76-86.
90. **Klein J.** Normobaric pulmonary oxygen toxicity. *Anesthesia & Analgesia*. 1990, 70:195-207.
91. **Schäfer V, von Briesen H, Rübsamen-Waigmann H, Steffan AM, Royer C, Kreuter J.** Phagocytosis and degradation of human serum albumin microspheres and nanoparticles in human macrophages. *Journal of Microencapsulation*. 1994, 11:261-269.
92. **Rosenblum WI, Hadfield MG, Martinez AJ, Schatzki P.** Alterations of liver and spleen following intravenous infusion of fluorocarbon emulsions. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* . 1976, 100:213-217.
93. **Nanney L, Fink LM, Virmani R.** Perfluorochemicals. Morphologic changes in infused liver, spleen, lung, and kidney of rabbits. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 1984, 108:631-637.

-
94. **Dejana E, Orsenigo F, Lampugnani MG.** The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability. *Journal of Cell Science*. 2008, 121:2115-2122.
95. **Uehara K.** Distribution of adherens junction mediated by VE-cadherin complex in rat spleen sinus endothelial cells. *Cell and Tissue Research*. 2006, 323:417-424.
96. **Drenckhahn D, Wagner J.** Stress Fibers in the Splenic Sinus Endothelium In Situ: Molecular Structure, Relationship to the Extracellular Matrix, and Contractility. *The Journal of cell biology*. 1986, 102:1738-1747.
97. **Eckert BS, Koons SJ, Schantz AW, Zobel CR.** Association of creatine phosphokinase with the cytoskeleton of cultured mammalian cells. *The journal of cell biology*. 1980, 86:1-5.
98. **Keipert PE, Otto S, Flaim SF, Weers JG, Schutt EA, Pelura TJ, Klein DH, Yaksh TL.** Influence of Perflubron emulsion particle size on blood half-life and febrile response in rats. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*. 1994, 22:1169-1174.
99. **Ferenz KB, Waack IN, Mayer C, de Groot H, Kirsch M.** Long-circulating poly(ethylene glycol)-coated poly(lactid-coglycolid) microcapsules as potential carriers for intravenously. *Journal of Microencapsulation*. 2013, 30:632-642.
100. **Chang TMS, Powanda D, Yu WP.** Analysis of Polyethylene-glycol-poly lactide Nano-Dimension Artificial Red Blood Cells in Maintaining Systemic Hemoglobin Levels and Prevention of Methemoglobin formation. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*. 2003, 31:231–247.
101. **Chang TMS.** Red blood cell replacement, or nanobiotherapeutics with enhanced red blood cell functions? *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*. 2015, 43:145-147.
102. **Phupoksakul T, Leuangasukrerk M, Numpiboonmarn P, Somwangthanaroj A, Janjarasskul T.** Properties of poly(lactide)-whey protein isolate laminated films. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2015, 95:715-721.
103. **Sothornvit R, Krochta JM.** Oxygen Permeability and Mechanical Properties of Films from Hydrolyzed Whey Protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* . 2000, 48:3913-3916.

104. **Isaka M, Sakuma I, Imamura M, Makino Y, Fukushima S, Nakai K, Shiiya N, Kenmotsu O, Kitabatake A, Yasuda K.** Experimental Studies on Artificial Blood Usage for Hemodilution during Cardiopulmonary Bypass. *Annals of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 2005, 11:238-244.
105. **Isaka M, Sakuma I, Shiiya N, Fukushima S, Nakai K, Kitabatake A, Yasuda K.** Experimental Study of the Relationship between Perfluoro-Octyl Bromide Emulsion and Norepinephrine Release in Reperfusion Arrhythmia: Isolated Guinea Pig Heart Model. *Annals of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 2008, 14:363-368.
106. **Gale SC, Gorman GD, Copeland JG, McDonagh PF.** Perflubron Emulsion Prevents PMN Activation and Improves Myocardial Functional Recovery After Cold Ischemia and Reperfusion. *Journal of Surgical Research* . 2007, 138:135-140.
107. **Segel LD, Rendig SV.** Isolated working rat heart perfusion with perfluorochemical emulsion Fluosol-43. *The American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* . 1982, 242:H485-H489.
108. **Segel LD, Follette DM, Iguidbashian JP, Contino JP, Castellanos LM, Berkoff HA, Kaufman RJ, Schweighardt FK.** Posttransplantation Function of Hearts Preserved with Fluorochemical Emulsion. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*. 1994, 13:669-680.
109. **Ashruf JF, Ince C, Bruining HA.** Regional ischemia in hypertrophic Langendorff-perfused rat hearts. *The American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 1999, 277:H1532-H1539.
110. **Assayang P, Charlemagne D, Marty I, de Leiris J, Lompré AM, Boucher F, Valère PE, Lortet S, Swynghedauw B, Besse S.** Effects of sustained low-flow ischemia on myocardial function and calcium-regulating proteins in adult and senescent rat hearts. *Cardiovascular Research*. 1998, 38:169-180.
111. **Brunet J, Boily MJ, Cordeau S, des Rosiers C.** Effects of N-Acetylcysteine in the rat heart perfused after low-flow ischemia: evidence for a direct scavenging of hydroxyl radicals and nitric oxide-dependent increase in coronary flow. *Free Radical Biology and Medicine*. 1995, 5:627-638.

112. **McCormack JG, Barr RL, Wolff AA, Lopaschuk GD.** Ranolazine Stimulates Glucose Oxidation in Normoxic, Ischemic, and Reperfused Ischemic rat Hearts. *Circulation*. 1996, 93:135-142.
113. **Sutherland FJ, Hearse DJ.** The isolated blood and perfusion fluid perfused heart. *Pharmaceutical Research*. 2000, 41:613-627.
114. **Pasdois P, Parker JE, Griffiths EJ, Halestrap AP.** Hexokinase II and Reperfusion Injury TAT-HK2 Peptide Impairs Vascular Function in Langendorff-perfused Rat Hearts. *Circulation Research*. 2013, 112:e3-e7.
115. **Bell RM, Mocanu MM, Yellon DM.** Retrograde heart perfusion: The Langendorff technique of isolated heart perfusion. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2011, 50:940-950.
116. **Dhein S, Mohr FW, Delmar M.** The Langendorff heart. *Practical Methods in cardiovascular research*. 2005:155-172.
117. **Krebs HA, Henseleit K.** Untersuchungen ueber die Harnstoffbildung im Tierkoerper. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie*. 1932, 210:33-36.
118. **Segel LD, Ensunsa JD.** Albumin improves stability and longevity of perfluorochemical-perfused hearts. *American Journal of Physiology*. 1988, 254:H1105-H1112.
119. **Rahamathulla PM, Watanabe K, Ashraf M, Millard RW.** Prevention of lactate prduction and myocyte injury in isolated rat hearts perfused with perfluorochemical emulsion. *Experimental and Molecular Pathology*. 1985, 28:157-165.
120. **McDonagh P, Cerney K, Hokama J, Lai G, Gonzales R, Davis-Gorman G, Copeland J.** Perflubron Emulsion Reduces Inflammation during Extracorporeal Circulation. *Journal of Surgical Research*. 2001, 99:7-16.
121. **Rosoff JD, Soltow LO, Vocolka CR, Schmer G, Chandler WL, Cochran RP, Kunzelman KS, Spiess BD.** A second-Generation Bloos Substitute (Perfluorodichlorooctane Emulsion) Does Not Activate Complement During an Ex Vivo Circulation Model of Bypass. *Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia*. 1998, 12:397-401.

-
122. **Evans GO.** *Animal Clinical Chemistry: A Practical Handbook for Toxicologists and Biomedical Researchers, Second Edition.* s.l. : CRC Press, 2009. ISBN9781420080117.
123. **Welte M.** Is there a "critical hematocrit"? *Der Anaesthesist.* 2001, 50:2-8.
124. **Lundgren CEG, Bergoe GW, Tyssebotn IM.** Intravascular Fluorocarbon-stabilized Microbubbles Protect Against Fatal Anemia in Rats. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology.* 2006, 34:473-486.
125. **Yokoyama K, Yamanouchi K, Ohyanagi H, Mitsuno T.** Fate of perfluorochemicals in animals after intravenous injection or hemodilution with their emulsions. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin.* 1978, 26:956-966.
126. **Winslow RM, Lohmann J, malavalli A, Vandegriff KD.** Comparism of PEG-modified albumin and hemoglobin in extreme hemodilution in the rat. *Journal of Applied Physiology.* 2004, 97:1527-1534.
127. **Gellhorn E.** Oxygen deficiency, carbon dioxide and temperature regulation. *American Journal of Physiology.* 1937, 120:190-194.
128. **Keitel J, Hussmann B, Lendemans S, de Groot H, Rohrig R.** Comparison of Malated Ringer's with Two Other Balanced Crystalloid Solutions in Resuscitation of Both Severe and Moderate Hemorrhagic Shock in Rats. *BioMed Research International.* 2015, 2015:1-9.
129. **Anderson ME.** Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods in Enzymology.* 1985, 113:548-555.

9 Anhang

Tabelle 17: Beim dem Versuch der optimierten Kapselsynthese verwendeten Syntheseparameter und die jeweilig gemessenen Kapseldurchmesser.

Syntheseparameter				Durchmesser [nm] (n=2)		
Behältnis	Gesamtvolumen [ml]	Beschallungsart	Synthesedauer [Minuten]	minimal	maximal	mittel
Falcon	6	kontinuierlich	1,5	224	2466	1028
			5	106	1677	593
			10	118	1184	399
		pulsartig	5	281	3442	1259
			10	218	3551	1080
	3	kontinuierlich	1,5	305	1946	883
			5	73	1595	438
			10	70	692	252
		pulsartig	5	246	2742	1042
			10	243	2012	838
Reagenzglas Ø 10 mm	3	kontinuierlich	1,5	83	1347	649
			5	85	1174	424
			10	91	1731	384
		pulsartig	5	110	3775	1038
			10	162	1874	691
Reagenzglas Ø 8 mm	3	kontinuierlich	1,5	90	2106	463
			5	95	1494	360
			10	104	1053	407
		pulsartig	5	164	2499	898
			10	269	1856	807

9.1 Abkürzungsverzeichnis

ALAT	Alanin-Aminotransferase
ASAT	Aspartat-Aminotransferase
AUT	Österreich
BGA	Blutgasanalyse
BSA	Bovines Serum Albumin
CK	Creatin-Kinase
DE	Deutschland
EtOH	Ethanol
FITC	Fluorescein isothiocyanate
GB	Great Britain
HE	Hämatoxylin-Eosin
HSA	Humanes Serum Albumin
KCN	Kaliumcyanid
KGW	Körpergewicht
KH-Puffer	Krebs Henseleit-Puffer
LDH	Laktatdehydrogenase
LVDP	links ventrikulär entwickelter Druck
MAP	mittlerer arterieller Blutdruck
Min	Minute
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PBST	Phosphat gepufferte Salzlösung + 0,5% Tween
PDI	Polydispersitätsindex
PFC	Perfluorocarbon
PFD	Perfluorodecalin
PP-Puffer	Phosphatpuffer
RPP	Rate Pressure Product
UK	United Kingdom
USA	United States of America

9.2 Publikationsliste, Konferenzteilnahmen und Preise

9.2.1 Eigene Publikationen

- **Wrobeln A**, Kirsch M, Ferenz KB,
“Albumin-derived perfluorocarbon-based artificial oxygen carriers in a model of hemodilution”. (in preparation)
- **Wrobeln A**, Kirsch M, Ferenz KB,
“Improved albumin-derived perfluorocarbon-based artificial oxygen carriers: in-vivo evaluation of biocompatibility”.
Advances in Biotechnology and microbiology, 2017, 7:1-7
- **Wrobeln A**, Schlüter KD, Linders J, Zähres M, Mayer C, Kirsch M, Ferenz KB,
“Functionality of albumin-derived perfluorocarbonbased artificial oxygen carriers in the Langendorff-heart”.
Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology, 2017, 45:723-730
- **Wrobeln A**, Laudien J, Groß-Heitfeld C, Linders J, Mayer C, Wilde B, Knoll T, Naglav D, Kirsch M, Ferenz KB
“Albumin-derived perfluorocarbon-based artificial oxygen carriers: A physico-chemical characterization and first in vivo evaluation of biocompatibility”.
European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2017, 115:52–64

9.2.2 Wissenschaftliche Vorträge

- **Wrobeln A**, Schlüter KD, Linders J, Zähres M, Mayer C, Kirsch M, Ferenz KB
„And the beat goes on: Functionality of albumin-derived perfluorocarbon-based artificial oxygen carriers in the Langendorff heart”
7. NRW Nanokonferenz, 12/2016 in Münster
- **Wrobeln A**, Schlüter KD, Linders J, Zähres M, Mayer C, Kirsch M, Ferenz KB
„And the beat goes on: Funktionalität von künstlichen Sauerstoffträgern im Langendorff-Modell“.
22. Workshop „Zell- und Gewebeschädigung: Mechanismen, Protektion und Therapie“, 11/2016 in Xanten

- **Wrobeln A**, Ferenz KB, Schlüter KD, de Groot H
„Künstliche Sauerstoffträger im Langendorff-Modell“.
21. Workshop „Zell- und Gewebeschädigung: Mechanismen, Protektion und Therapie“, 11/2015 in Xanten.
- **Wrobeln A**, Ferenz KB, Kirsch M, Mayer C, Laudien J, de Groot H
„In vivo-Verträglichkeit von Perfluorodecalin gefüllten Albuminkapseln“.
20. Workshop „Zell- und Gewebeschädigung: Mechanismen, Protektion und Therapie“, 11/2014 in Xanten.
- **Wrobeln A**, Ferenz KB, Kirsch M, de Groot H
„Haemorheological Influence of Perfluorodecalin filled capsules in varying carrier solutions“.
BIOME-Gratuante School of Biomedical Science, 02/2014 in Essen.
- **Wrobeln A**, Ferenz KB, Kirsch M, de Groot H
„In vitro Untersuchungen von Perfluorodecalin gefüllten Albuminkapseln als mögliche künstliche Sauerstoffträger“.
19. Workshop „Zell- und Gewebeschädigung: Mechanismen, Protektion und Therapie“, 11/2013 in Xanten.

9.2.3 Posterpräsentationen

- **Wrobeln A**, Kirsch M, Ferenz KB
„Albumin-derived perfluorocarbon-based artificial oxygen carriers improved survival in a model of massive hemodilution in the rat“.
7th international colloids conference, 06/2017 in Barcelona
- **Wrobeln A**, Schlüter KD, Linders J, Zähres M, Mayer C, Kirsch M, Ferenz KB
„And the beat goes on: Functionality of albumin-derived perfluorocarbon-based artificial oxygen carriers in the Langendorff heart“.
7. NRW Nanokonferenz, 12/2016 in Münster
- **Wrobeln A**, Laudien J, Kirsch M, Mayer C, de Groot H, Ferenz KB
„Biocompatibility of Perfluorodecalin-filled Albumin-nanocapsules as potential artificial oxygen carriers“.
CENIDE Nanobiophotonics Symposium 2015, 03/2015 in Essen.

9.2.4 Published Abstracts

- Scheer A, **Wrobeln A**, Kirsch M, Ferenz KB
“Albumin-derived perfluorocarbon-based artificial oxygen carriers: Assessment of microcirculation and physiological functions in a model of massive hemodilution in the rat”.
Journal of Nanomedicine & Nanotechnology, 2017, 8:87

9.2.5 Preise

- „**CENIDE Best Paper Award 2017**“ für “Albumin-derived perfluorocarbon-based artificial oxygen carriers: A physico-chemical characterization and first in vivo evaluation of biocompatibility” in *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 115 (2017), 52-64

9.3 Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

9.4 Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel

„Präklinische Untersuchung von Perfluorodecalin gefüllten Albuminkapseln als Blutersatzstoff in vitro, am isolierten Organ sowie im lebenden Tier“

selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Die Stellen der Arbeit sowie evtl. beigefügte Abbildungen, Zeichnungen oder Grafiken, die anderen Werken dem Wortlaut oder Sinn nach entnommen wurden, habe ich unter Angabe der Quelle als Entlehnung kenntlich gemacht.

Die Arbeit ist noch nicht an anderer Stelle als Prüfungsleistung vorgelegt worden.

Velbert, den 04. Oktober 2017

Anna Wrobeln

9.5 Danksagung

Ein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. Herbert de Groot für die freundliche Übernahme in das Institut. Nach meiner bereits dort absolvierten Masterarbeit gab er mir die Möglichkeit, meine Doktorarbeit anzuschließen und so noch tiefer in die Thematik einzutauchen. Bis zu seinem Tod hatte er stets ein offenes Ohr für jegliche Fragestellungen und seine kritischen Diskussionen waren immer zielführend.

Ebenso gilt mein ausgesprochener Dank Herrn Prof. Dr. Michael Kirsch, der die Aufgabe des Erstgutachters prompt übernommen hat und immer für Fragestellungen und Probleme ansprechbar war. Die vielen aufschlussreichen Erklärungen, die sich innerhalb von kritischen Diskussionen mit Ihm ergaben haben mich stets motiviert und vorangebracht.

Des Weiteren bedanke ich mich besonders bei Herrn Prof. Dr. Christian Mayer für seine Bereitschaft, als Zweitgutachter zu fungieren und für zahlreiche wissenschaftliche Hilfestellungen sowie die Einbindung seiner Mitarbeiter in experimentelle Aufgabenstellungen.

Außerdem möchte ich mich ganz besonders herzlich bei meiner Betreuerin Frau Dr. Katja Ferenz bedanken, die mir mit viel Geduld unterstützend zur Seite stand und bei Bedarf immer viel Zeit investierte. Ich fühlte mich über die gesamte Zeit hervorragend betreut.

Ein besonderer Dank geht auch an Herrn Prof. Dr. Klaus Dieter Schlüter des Instituts für Physiologie der Universität Gießen. Das Projekt des isoliert perfundierten Herzens konnte nur durch seine Beteiligung stattfinden.

Für die Durchführung der Versuche mittels Rasterelektronenmikroskopie geht mein Dank an Frau Prof. Dr. Elke Winterhager.

Ebenso geht ein Dank an Herrn Prof. Dr. Matthias Eppe für die Bereitstellung des Zetasizer ZS. Genauso geht der Dank an seine Mitarbeiter für die freundliche Einweisung in die Handhabung des Gerätes.

Meinem Laborkollegen Herrn Johannes Jägers danke ich für die zahlreichen und unermüdlichen fachlichen Gespräche, Ratschläge und Anmerkungen, die mich auf dem Weg zur fertigen Arbeit immer wieder neue Aspekte und Ansätze entdecken

ließen. Auch die vielen nichtwissenschaftlichen und motivierenden Gespräche haben meine Arbeit unterstützt.

Danken möchte ich zudem Frau Lisa Brencher, Frau Alexandra Scheer, Frau Birgit Podleska, Frau Eva Hillen, Frau Susanne Eitner, Frau Dr. Maren Oude Lansink, Frau Dr. Johanna Teloh, Frau Dr. Julia Laudien, Frau Dr. Katharina Effenberger-Neidnicht, Frau Dr. Rabea Verhaegh und Herrn Falk Kaehler ohne die meine Promotionszeit deutlich langweiliger gewesen wäre. Auch allen anderen Mitarbeitern des Instituts für Physiologische Chemie gilt mein großer Dank für eine stets angenehme und lockere Arbeitsatmosphäre.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern Elke und Wolfgang sowie meiner Schwester Marina und meinen Großeltern Hannelore und Gerd bedanken, die mir das Studium und die Promotion überhaupt erst ermöglicht haben und mich die komplette Zeit über moralisch unterstützt haben.

Ein ebenso großer Dank geht an Fabian Blumeroth, der immer vorbehaltlos hinter mir steht und ohne den es niemals zur Promotion gekommen wäre.